

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Experimentální chirurgie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**MUDr. Simona Maléřová**

**Epidemiologické a imunologické aspekty HPV etiologie nádorů hlavy a krku**

*Epidemiological and immunological aspects of HPV etiology of head and neck cancers*

Typ závěrečné práce: Disertační práce

**Školitel: prof. MUDr. Jan Klozar, CSc.**

**Konzultant: RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.**

Praha, 2021



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 09. 08. 2021

MUDr. Simona Maléřová

Podpis

Identifikační záznam:

MALÉŘOVÁ, Simona. ***Epidemiologické a imunologické aspekty HPV etiologie nádorů hlavy a krku.*** [*Epidemiological and immunological aspects of HPV etiology of head and neck cancers*]. Praha, 2021. Počet stran 80. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole. Školitel Klozar, Jan.

**Poděkování:**

Děkuji svým školitelům prof. MUDr. Janu Klozarovi, CSc. a RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. za pomoc při stanovení cílů jednotlivých studií, optimalizaci sběru, zpracování a hodnocení vzorků, za odborné směřování, cenné rady a podporu po celou dobu mého studia.

Taky děkuji vědeckým pracovníkům ÚHKT a BIOCEV jmenovitě RNDr. Evě Hamšíkové, RNDr. Věře Ludvíkové, RNDr. Janě Šmahelové, RNDr. Martině Salákové, Ph.D., Mgr. Janě Rychlé a Blance Langové za odborné rady a pomoc při práci v laboratoři.

Dále děkuji všem kolegům především současnému přednostovi Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole prof. MUDr. Janu Plzákovi, Ph.D. a emeritnímu přednostovi prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc., FCMA za jejich vstřícnost a pracovní zázemí s velkou podporou postgraduálního studiu.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantového projektu GAUK č. 114216.

## ABSTRAKT

Výskyt orofaryngeálních nádorů asociovaných s lidskými papilomaviry (HPV) neustále stoupá. Informace o prevalenci orálního HPV a jejích rizikových faktorech jsou velmi důležité pro budoucí screening a včasnou diagnostiku onemocnění.

Tato práce řeší tři témata. Jako první téma je zhodnocení prevalence HPV v ústní dutině u zdravé populace a zkoumání rizikových faktorů orální HPV infekce. Tato data ve střední Evropě téměř chybí.

V souboru věkově starších nevakcinovaných pacientů byla nalezena statisticky významně vyšší míra pozitivita (8,8 %) orální HPV infekce než u mladších, částečně vakcinovaných, dobrovolníků (2,0 %). Míra seropozitivity anamnestických HPV protilátek byla v obou souborech srovnatelná. Žádný z analyzovaných rizikových faktorů nebyl významně spojen s orální HPV pozitivitou.

Druhé téma, kterým se práce zabývá, je dynamika HPV specifických protilátek u pacientů s nádory hlavy a krku a jejich prognostický význam. Posuzovali jsme význam anamnestických protilátek a taky protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 při dlouhodobém sledování 2-14 let od ukončení léčby.

Hladina HPV-specifických protilátek se statisticky signifikantně snížila během dlouhodobého sledování u nerecidivujících pacientů. Pokles HPV16 E6 protilátek po prvním roce sledování byl spojen s lepším celkovým přežitím (OS). Statisticky významný pokles anamnestických protilátek byl pozorován v průměru s odstupem více než 10 let od ukončení léčby.

Třetí téma disertační práce je hodnocení prognostického významu HPV/p16 pozitivita u pacientů chirurgicky léčených pro karcinom dutiny ústní. Úloha p16 pozitivita u karcinomů dutiny ústní není tak jasná jako u karcinomů orofaryngu. Některé studie ukazují dokonce horší prognózu pacientů s HPV/p16 pozitivním karcinomem dutiny ústní.

Pozitivita p16 proteinu byla zjištěna u 8,3 % pacientů chirurgicky léčených pro karcinom dutiny ústní. V souboru byla exprese p16 prokázána jako nejvýznamnější faktor negativně ovlivňující celkové 5leté přežití pacientů až 4krát ( $p=0,019$ ). Dalšími faktory statisticky významně ovlivňující přežití byly: T status, N status a recidiva základního onemocnění.

Závěry: Nižší prevalence orální HPV DNA u mladších účastníků naznačuje pozitivní vliv očkování proti HPV.

Dynamika HPV-specifických protilátek po jednoročním i dlouhodobém sledování je významným prognostickým faktorem.

Expres p16 má u karcinomů dutiny ústní bezesporu jiný význam než u karcinomů orofaryngu. Zdá se, že p16 pozitivita je negativním prognostickým faktorem, nicméně význam přítomnosti HPV/p16 proteinu u nádorů mimo orofaryngeální lokalizaci zůstává nejasný.

Klíčová slova: karcinomy hlavy a krku, orální prevalence HPV, HPV specifické protilátky, prognóza, p16 exprese

## SUMMARY

The incidence of human papillomavirus (HPV) -associated oropharyngeal tumors is steadily increasing therefore, information about the prevalence of oral HPV and its risk factors is very important for future screening and early diagnosis of the disease.

This thesis addresses three topics. The first topic is to evaluate the prevalence of oral HPV in a healthy population and to investigate risk factors for oral HPV infection, given that these data are almost completely absent in Central Europe.

A statistically significantly higher rate of positivity (8.8%) of oral HPV infection was found in the group of older unvaccinated probands than in younger partially vaccinated volunteers (2.0%). The seropositivity rate of anamnestic HPV antibodies was comparable in both groups. None of the analyzed risk factors were significantly associated with oral HPV positivity.

The second topic of the thesis is the dynamics of HPV specific antibodies in patients with head and neck cancer and their prognostic significance. In patients with cervical cancer, a decrease in HPV E6 / E7-specific antibodies is associated with a better prognosis. Another goal of the dissertation was to assess the importance of anamnestic antibodies and antibodies against oncoproteins E6 and E7 in long-term follow-up 2-14 years after the end of treatment.

The level of HPV-specific antibodies decreased in a statistically significant manner during long-term follow-up in non-recurrent patients. A decrease in HPV16 E6 antibodies after the first year of follow-up was associated with better overall survival (OS). A statistically significant decrease in anamnestic antibodies was observed on average more than 10 years after the end of treatment.

The third topic of the thesis is the evaluation of the prognostic significance of HPV / p16 positivity in patients surgically treated for oral squamous cancer. The role of p16 positivity is not as clear as in oropharyngeal carcinomas, some studies show worse prognoses for patients with HPV / p16 positive oral cancer.

Of patients surgically treated for oral cancer, 8.3% were p16 positive. In the cohort, P16 protein expression was shown to be the most important factor impacting survivability. Its expression negatively affected patient survival up to 4 times ( $p = 0.019$ ). Other factors which had a statistically significant influence on survival were: T status, N status and recurrence of the underlying disease.

Conclusions: The lower prevalence of oral HPV DNA in younger participants suggests a positive effect of HPV vaccination.



The value of HPV-specific antibodies after one-year and long-term follow-up is an important prognostic factor.

P16 protein expression has a different significance in oral cancers than in oropharyngeal cancers. P16 positivity appears to be a negative prognostic factor, however, the significance of the presence of HPV / p16 protein in tumors with non-oropharyngeal location remains unclear.

Key words: head and neck cancers, oral prevalence of HPV, HPV specific antibodies, prognosis, p16 expression

## OBSAH

1. ÚVOD.....	12
1.1 Charakteristika lidských papilomavirů.....	12
1.1.1 Klasifikace.....	13
1.1.2 Stavba virového genomu.....	14
1.1.3 Životní cyklus HPV.....	15
1.1.4 Integrace a proces maligní transformace.....	15
1.2 Výskyt orální HPV u zdravé populace.....	16
1.2.1 Používané metody detekce a genotypizace HPV.....	17
1.2.2 Prevalence orální HPV infekce.....	17
1.2.3 Perzistence orální HPV infekce.....	19
1.2.4 Rizikové faktory pro orální HPV infekci.....	19
1.2.5 Význam vakcinace.....	20
1.3 Souvislost HPV infekce s nádory orofaryngu.....	21
1.4 Souvislost HPV infekce s nádory dutiny ústní.....	24
1.5 Souvislost HPV infekce s nádory hrtanu.....	25
1.6 Možnosti detekce HPV infekce.....	26
1.6.1 Detekce HPV DNA.....	26
1.6.2 Detekce HPV RNA.....	26
1.6.3 Detekce proteinu p16 a p53 pomocí imunohistochemie.....	27
1.6.4 Sérologie.....	27
1.7 Význam HPV specifických protilátek k stanovení prognózy.....	28
2. CÍLE PRÁCE.....	30
3. MATERIÁL A METODIKA.....	32
3.1 Cíl I – Prevalence a rizikové faktory orální HPV infekce u zdravé populace.....	32
3.1.1 Charakteristika souboru pacientů a dotazníky.....	32
3.1.2 HPV DNA detekce, genotypizace.....	34
3.1.3 Sérologické vyšetření.....	34
3.1.4 Statistická analýza.....	35
3.2 Cíl II – Prognostický význam HPV-specifických protilátek po léčbě u pacientů s nádory orofaryngu.....	36
3.2.1 Charakteristika souboru pacientů.....	36
3.2.2 Serologické vyšetření.....	37
3.2.3 Statistická analýza.....	38
3.3 Cíl III – Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní.....	38
3.3.1 Charakteristika souboru pacientů.....	38
3.3.2 Imunohistochemie, HPV DNA detekce a genotypizace.....	39
3.3.3 Statistická analýza.....	40
4. VÝSLEDKY.....	42
4.1 Cíl I – Prevalence a rizikové faktory orální HPV infekce u zdravé populace.....	42

4.2	Cíl II – Prognostický význam HPV-specifických protilátek po léčbě u pacientů s nádory orofaryngu.....	49
4.2.1	Změny v dynamice hladiny protilátek během prvního roku sledování.....	49
4.2.2	Změny v dynamice hladiny protilátek při dlouholetém sledování .....	52
4.3	Cíl III – Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní	53
4.3.1	Expresí proteinu p16 – vztah k demografickým a klinicko-patologickým parametrům.....	53
4.3.2	Faktory ovlivňující pětileté přežití.....	56
5.	DISKUZE .....	62
5.1	Cíl I – Prevalence a rizikové faktory orální HPV infekce u zdravé populace .....	62
5.2	Cíl II – Prognostický význam HPV-specifických protilátek po léčbě u pacientů s nádory orofaryngu.....	64
5.3	Cíl III – Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní	66
6.	ZÁVĚRY .....	68
7.	LITERATURA.....	69
8.	PŘÍLOHY .....	80
8.1	Publikace, které jsou podkladem disertace .....	80
8.2	Publikace bez vztahu k tématu disertace .....	80

## 1. ÚVOD

Lidské papilomaviry (HPV) jsou nejčastějšími DNA viry podílejícími se na nádorové transformaci. Kromě dobře prozkoumané asociace HPV s karcinomy děložního hrdla (KDH), se tento virus podílí na karcinomech konečníku, urogenitálního traktu (vulva, pochva, penis) a ve významné míře je asociován také s karcinomy hlavy a krku (HNC), především nádory orofaryngu. Incidence karcinomů orofaryngu v posledních letech významně stoupá. Ve všech zemích, kde jsou k dispozici onkologické registry, je možné dokumentovat nárůst incidence. Ve skupině pacientů s těmito nádory stoupá podíl nádorů asociovaných s vysoce rizikovými typy (HR) HPV. Prudký nárůst HPV pozitivních nádorů byl pozorován nejprve v Severní Americe a, s určitým zpožděním, i v Evropě. V současnosti je prevalence těchto nádorů orofaryngu v obou regionech podobná (Mehanna et al., 2012). V České republice bylo na začátku tisíciletí přibližně 60 % nádorů tonzil HPV pozitivních (Rotnaglova et al., 2011). Podle některých analýz budou HPV asociované HNC v horizontu 10 let častější než KDH, který je téměř ve 100 % asociovaný s HPV infekcí (Gillison et al., 2014). Možnost screeningu přednádorových lézí v této anatomické lokalizaci, by měla velký význam. Virus je v organismu přítomen dlouho před rozvojem nemoci. Podle některých studií lze prokázat přítomnost protilátek proti onkoproteinu HPV16 E6, markerem invazivního karcinomu vyvolaného HPV, až 10 let před diagnózou HPV asociovaných nádorů (Kreimer, 2014). Aktuální znalosti o prevalenci HPV ve zdravé populaci jsou skromné a diskrepantní. Ze střední Evropy tato data chybí.

### 1.1 Charakteristika lidských papilomavirů

Ve 30. letech 20. století byl HPV druhou skupinou virů (po retrovirech), u které byla prokázána schopnost onkogeneze, a to experimentálně u králíků (Shope and Hurst, 1933). Koncept nádorové imunologie se v 50. letech 20. století rychle rozvinul s myšlenkou, že imunitní systém dokáže rozeznat „vlastní“ a „cizí“ antigeny. Australský imunolog Sir Frank Macfarlane Burnet a Peter Medawar z University College London získali v roce 1960 Nobelovu cenu za medicínu za objev imunologické tolerance. Epidemiologické studie na počátku 70. let uváděly různé infekční kandidáty jako kauzální agens karcinomu děložního hrdla (KDH). Nejpravděpodobnějším byl virus herpes simplex typu 2 (HSV-2). Harald zur Hausen, mladý německý profesor virologie, však nebyl přesvědčen o této teorii, protože nenalezl HSV-2 ve vzorcích KDH. V roce 1982 člen jeho týmu Mathias Durst izoloval nový typ HPV 16 z biopsie KDH (Durst et al., 1983). Následně byl HPV 16 typ nalezen v polovině

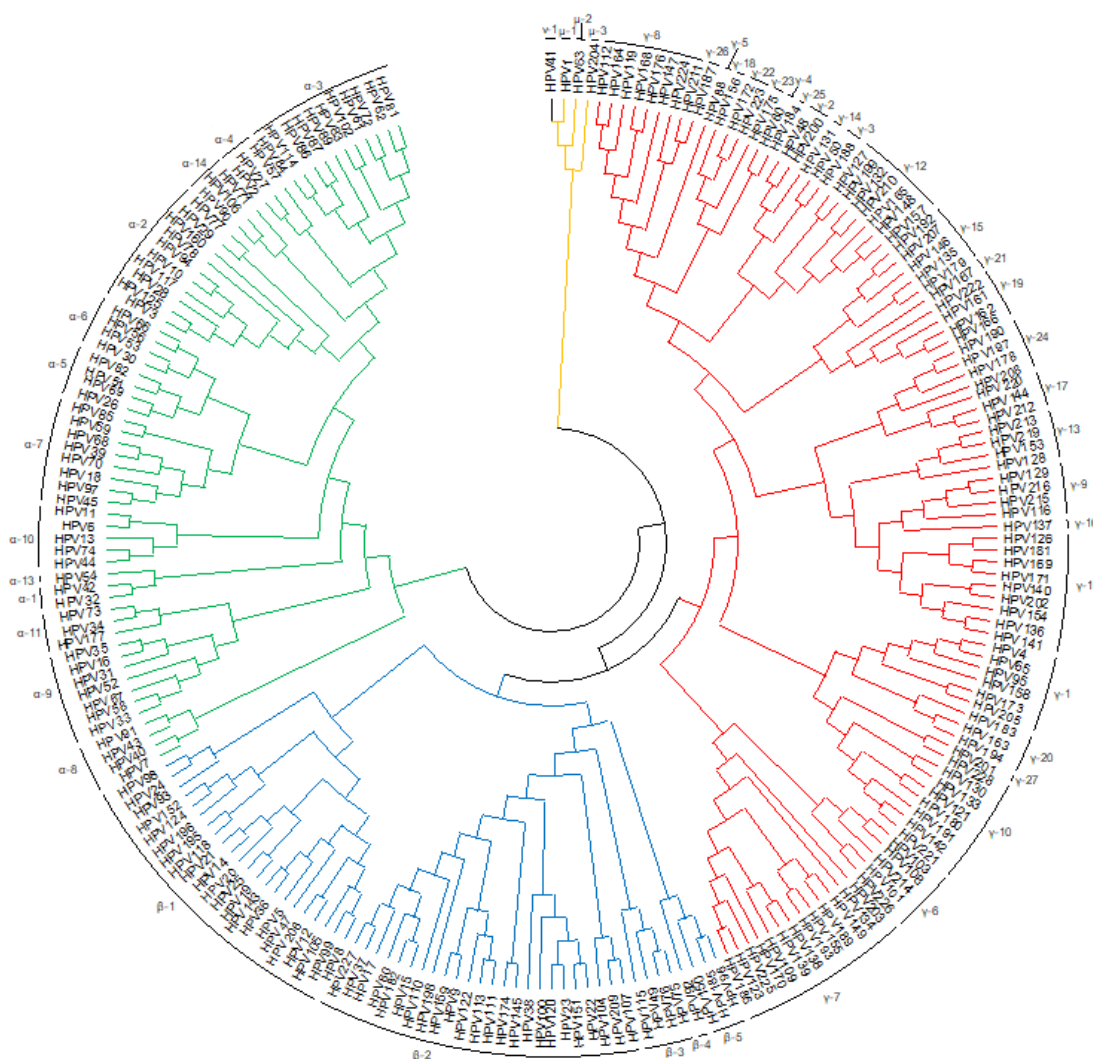
všech laboratorních vzorků těchto nádorů. Skupina poté pokračovala k nalezení HPV 18. Dnes víme, že společně lze nalézt tyto dva vysoce rizikové typy přibližně u 70 % všech karcinomů děložního hrdla (KDH) (Munoz, 2003). Již v roce 1984 prof. zur Hausen zahájil výzkum k výrobě vakcíny proti HPV. V roce 2008 profesor Harald zur Hausen dostal Nobelovu cenu za objevení asociace HPV infekce se vznikem KDH.

V roce 2006 byla americkým ústavem pro kontrolu léčiv (FDA – Food and Drug Administration) a následně i Evropským regulačním úřadem EMA schválená tetravalentní vakcína proti HPV (Gardasil, Merck). V roce 2009 byla schválená bivalentní vakcína proti dvěma vysoce rizikovým typům HPV 16 a 18 (Cervarix, GlaxoSmithKline). Poslední schválenou vakcínou byla v roce 2014 vakcína nonavalentní proti devíti nejčastějším vysoce a nízké rizikovým typům HPV (Gardasil9, Merck).

#### 1.1.1 Klasifikace

V současnosti je definováno více než 200 typů (k datu vydání závěrečné práce bylo mezinárodním HPV referenčním centrem uváděno 228 typů). Systém klasifikace je založen na podobnosti nukleotidové sekvence genomů (Van Ranst et al., 1992). Čeleď papilomaviridae je dělena na rody, které se od sebe liší v nukleotidové sekvenci L1 genu o 40-55 %. Tyto rody jsou označeny řeckými písmeny (5 rodů – alpha, beta, gamma, mu a nu). HPV z rodu alfa (alfa-HPV) jsou označovány jako slizniční, z rodu beta, gama, mu a nu jako kožní. Dělení do druhů má význam hlavně v tom, že příslušníci jednoho druhu mají podobné biologické vlastnosti. Typ je tradičním taxonem v klasifikaci HPV, kde nukleotidové sekvence L1 genu se liší o 10-25 %.

Klinicky nejdůležitější dělení alfa-HPV (slizničních) typů je podle onkogenního potenciálu na vysoce rizikové (HR HPV) a nízké rizikové typy (LR HPV). Nízké rizikové (nejčastější typy: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89) způsobují benigní léze (papilomy, veruky, condylomata accuminata). Vysoce rizikové (nejčastější typy: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) mají onkogenní potenciál.



Obr.1: Fylogenetický strom založený na části L1 genomu znázorňující všechny oficiální typy HPV – staženo z oficiálních stránek International Reference Center for Papillomaviruses (Tamura - Nei, 1993; Kumar, 2016).

### 1.1.2 Stavba virového genomu

HPV virus je neobalený virus o velikosti virové kapsidy přibližně 55 nm, jehož genom je tvořený dvouvláknovou cirkulární DNA (délka přibližně 7400 až 8200 parů bazí). Kapsidy jsou tvořeny z pentamerické molekuly hlavního kapsidového proteinu a několik molekul vedlejšího kapsidového proteinu. Genom lze rozdělit na: regulační (LCR = long control

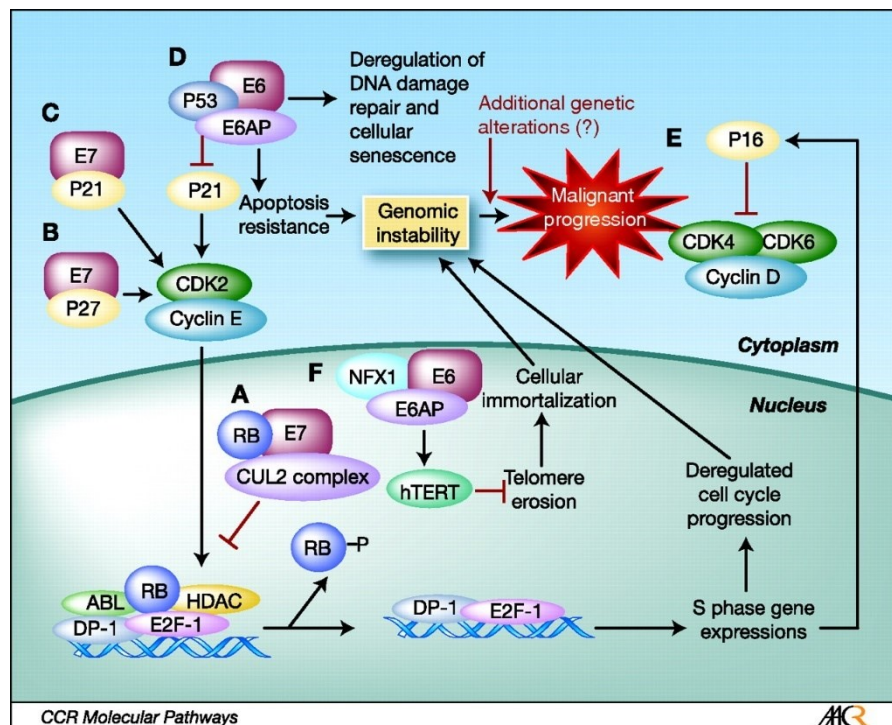
$\chi^2$ :                   $\chi^2$ :                  1        1         $\chi^2$

X = 1 DNA 1 : 1111 x1

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99

[illegible]

cyklu. Destabilizace proteinů pRb virovým proteinem E7 vede ke zvýšené expresi proteinu p16 (fyziologicky inhibitor cyklin dependentních kináz 4 a 6) a tím je cyklus zastaven v G1 fázi (Khleif et al., 1996).



Obr. 3: Maligní transformace způsobená onkoproteiny HPV E6 a E7, převzato Chung et al., 2014 (Chung et al., 2014)

A – vytvořen komplex E7 s Cullin 2 ubiquitin ligázou a proteinem retinoblastomu (pRb), toto vede k degradaci pRb;

B – interakce E7 s p27 proteinem;

C – interakce E7 s p21 proteinem;

D – vytvořen komplex E6 s ubikvitin ligázou E6AP což vede k degradaci p53 proteinu;

E – při absenci funkce pRB se v důsledku zpětné vazby zvýší exprese p16INK4a;

F – degradace NFX1 při sdružení E6 a E6AP s následnou aktivací hTERT vede k buněčné imortalizaci

## 1.2 Výskyt orální HPV u zdravé populace

Tato kapitola vychází z rešeršní práce autorky s názvem „Výskyt orální HPV infekce u zdravé populace: Systematický přehled se zaměřením na evropskou populaci“ jež byla v roce 2018 publikována (Simonidesova et al., 2018). Tato práce je součástí přílohy.



Do analýzy prevalence orální HPV ve zdravé evropské populaci bylo zařazeno 26 studií, které zahrnovaly 10 236 subjektů (4 352 mužů, 5 071 žen a 813 jedinců neznámého pohlaví, věkový rozsah od narození do věku 82 let). Studie byly prováděny na populaci Itálie (n = 7), Švédska (n = 4), Finska (n = 4), Řecka (n = 2), Polska (n = 2), Rakouska, Skotska, Nizozemí, Německa, Maďarska, Chorvatska a Dánska (n = 1).

#### 1.2.1 Používané metody detekce a genotypizace HPV

S výjimkou jedné studie, všechny ostatní použily k detekci HPV polymerázovou řetězovou reakci (PCR), tedy metodu amplifikující vybrané úseky genomu viru.

HPV genotypy byly stanovovány za využití Luminexu (N=11), sekvenace (N=8), hybridizace (N=4), polymorfismu délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism = RFLP) (N=1), nebo blíže nespecifikovanou genotypizací (N=2). Výhodou všech metod, s výjimkou sekvenace, je možnost detekovat i vícenásobnou infekci. Celkově bylo ve studiích detekováno 20 HR HPV typů (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, 86) a 15 LR HPV typů (HPV 6, 11, 30, 42, 43, 44, 54, 55, 57, 69, 70, 81, 84, 89 a 90).

#### 1.2.2 Prevalence orální HPV infekce

Celkem sedm evropských studií bylo zaměřeno na zdravou dospělou populaci. Celková prevalence orální HPV infekce ve zdravé populaci se pohybovala v rozmezí 1,4 % až 18,1 % (Tabulka č. 1).

Tab. 1: Studie HPV prevalence v dutině ústní zaměřené na zdravé dobrovolníky s počtem subjektů 100 a více a rizikové faktory orální HPV infekce

Autor studie	Grün	Kero	Nordfors	Lupato	Juan Du	Conway	Dalla-Torre
Prevalence	1,4 % (4/287)	10,3 % (27/262)	1,8 % (6/335)	4,0 % (20/500)	9,3 % (45/483)	5,5 % (21/380)	18,1 % (56/310)
Pohlaví	bez významu	NS	bez významu	bez významu	NS	bez významu	bez významu
Věk	bez významu	NS	NS	NS	NS	p=0,081	NS
Vakcinace	73,0 %	NS	64,0 %	8,6 %	NS	4,0 %	0,0 %
Sexuální chování	NS	Orální sex – zvýšená konkordance HPV typu mezi partnery	NS	bez významu	NS	bez významu	významné (vaginální i orální sex: $p = 0,0001$ )
Kouření	NS	u žen *	NS	bez významu	NS	NS	významné ( $p = 0,0074$ )
Alkohol	NS	NS	NS	bez významu	NS	NS	bez významu

NS – studie se nevjadruje k dané otázce; \* analýza manželských párů, statisticky signifikantně významné jen u žen

Většina publikovaných studií prevalence HPV v dutině ústní se zaměřovala na detekci alfa-HPV typů. Prevalence HR HPV typů byla v rozmezí 2,2 % až 7,2 %, z toho HPV16 pozitivita byla zjištěna u 0,2 % až 2,9 % jedinců. Největší studie na zdravé evropské populaci byla provedena v Itálii. Zahrnovala celkem 500 jedinců ve věku 19 až 35 let. HPV pozitivita byla zjištěna u 4,0 % zkoumané populace, HR HPV u 2,2 % a HPV16 u 1,6 % probandů (Lupato et al., 2017). Prevalence alfa-HPV v evropských studiích (HPV: 1,2-11,6 %, HR HPV: 2,2-7,2 % a HPV16: 0,2-2,9 %) byla shodná s výsledky studií z USA a Asie. Americká přehledová studie prevalence orální HPV infekce zahrnovala 18 studií, celkem se 4 581 zdravými probandy a zjistila, že prevalence orální HPV infekce byla 4,5 %, HR HPV infekce 3,5 % a HPV16 infekce 1,3 % (Kreimer et al., 2010). Asijská přehledová studie zařadila 29 studií provedených v období 2012 až 2015. V této studii bylo celkově 22 756 probandů. Výsledky ukázaly prevalenci orální HPV infekce 5,5 %; HR HPV: 2,7 % a HPV16: 1,0 % (Shigeishi and Sugiyama, 2016).

Pět studií bylo zaměřeno na prevalenci orální HPV infekce u dětí. Největší polská studie zkoumající prevalenci orální HPV infekce u dětí a dospívajících s více než 4 000 probandy ve věku 10 až 18 let zjistila celkovou prevalenci 1,1 % (Durzynska et al., 2011).

Prevalenci beta-HPV typů se věnoval ve své publikaci Sabol a kol., který zjistil, že u 67 jedinců bez příznaků infekce HPV byla prevalence orálních beta-HPV typů 56,7 %, což bylo významně vyšší v porovnání s alfa-HPV prevalencí v souboru zdravých kontrol (7,5 %). Nejčastějšími beta-HPV typy byly HPV38 (11,9 %), HPV110 (11,9 %) HPV8 (10,4 %) a HPV24 (10,4 %) (Sabol et al., 2016). V recentní asijské studii s 1426 zdravými probandy byla zjištěna orální prevalence: 2,5 % alfa-HPV, 11,9 % beta-HPV a 2,9 % gama-HPV (Wong et al., 2018).

### 1.2.3 Perzistence orální HPV infekce

Dvě studie ve finské populaci studovaly délku přetrvávání orální HPV infekce. Prevalence a perzistence HPV v dutině ústní byla sledována u žen po dobu 6 let, přičemž nejčastější byla infekce HPV16 (10,5 %) s průměrnou dobou perzistence 18,6 měsíců (Rautava et al., 2012). Další finská studie, tentokrát zaměřená na muže, ukázala rovněž jako nejčastější typ HPV16 (15,3 %). Průměrná doba přetrvávání infekce HPV16 byla pouze o málo delší, 21,7 měsíce. Jako rizikový faktor pro delší perzistenci HPV bylo identifikováno kouření (Kero et al., 2014). Délka perzistence HPV v dutině ústní byla v evropských studiích shodná s výsledky studie z USA. Kreimer a kol. ve své studii zkoumala orální HPV infekci u 1 626 mužů po dobu 4 let. Výsledky prokázaly, že průměrná doba perzistence HPV16 byla 7,3 měsíce a většina HPV infekcí v dutině ústní vymizela do 1 roku (Kreimer et al., 2013).

### 1.2.4 Rizikové faktory pro orální HPV infekci

Rakouská studie zahrnující 310 nevakcinovaných subjektů s věkovým průměrem 26,5 let uvádí jako statisticky významný rizikový faktor kouření (méně než 5 balíčkoroků:  $p=0,0215$ ; více než 5 balíčkoroků:  $p=0,0074$ ). Vysvětlením může být indukce zánětu a potlačení imunitních mechanismů chemickými látkami obsaženými v tabáku (Dalla Torre et al., 2016). Ve studii Gillison a kol. autoři ukazují, že ženy kuřačky mají mnohem vyšší prevalenci orální HPV infekce než muži kuřáci, i když obecně je prevalence HPV vyšší u mužů. Kouření je tedy považováno za významný rizikový faktor orální HPV infekce, zejména u žen (Gillison et al., 2012).

Dalším statisticky významným rizikovým faktorem je sexuální chování, a to jak orální sexuální styk (6-10 sexuálních partnerů:  $p=0,0437$ ; více než 11 sexuálních partnerů:  $<0,0001$ ), tak vaginální pohlavní styk, který je statisticky významný při počtu 11 a více sexuálních partnerů ( $p=0,0001$ ) (Dalla Torre et al., 2016). Několik mimoevropských studií zjistilo, že sexuální chování (tj. rodinný stav, počet sexuálních partnerů, rizikové sexuální partneři,

vaginální a orální sex) a také kouření a pití alkoholu jsou významnými rizikovými faktory pro orální HPV infekci (Gillison et al., 2012, Cook et al., 2014).

Evropské studie nepotvrdily statisticky významnou souvislost mezi prevalencí orální HPV infekce a pohlavím (Tabulka č. 1). Podobně v americké přehledové studii byla prevalence HPV u obou pohlaví shodná (4,6 % vs. 4,4 %) (Kreimer et al., 2010). Současné studie uvádějí prevalenci HPV nižší u žen (2,9 %) ve srovnání s muži (4,7 %), což by mohlo být vysvětleno poklesem rychlosti šíření HPV infekce u žen v souvislosti s očkováním proti HPV (Shigeishi and Sugiyama, 2016).

Věkově závislá prevalence HPV v dutině ústní byla v některých studiích prokázána a v jiných nikoliv. V největší studii z USA, která zahrnovala 5 579 probandů ve věku 14-69 let, byla orální HPV infekce detekována u 4,0 % vzorků. Nejvyšší prevalence byla pozorována ve věkové skupině 30 až 34 let (7,0 %) a 60 až 64 let (11,0 %). Autoři studie uvádějí jako možné vysvětlení dvou vrcholů infekce zvýšenou sexuální aktivitou při prvním maximu a sníženou efektivitou imunitních mechanismů v důsledku stárnutí při druhém zvýšení prevalence (Gillison et al., 2012).

Z evropských prevalenčních studií asociaci mezi věkem a prevalencí orálních HPV infekcí zkoumala pouze skotská studie s probandy ve věkovém rozmezí 16 až 69 let. Největší prevalence orální HPV byla ve věkové kategorii 26 až 39 let (10,4 %), nejnižší ve věkové skupině 16 až 25 let (2,6 %) (Conway et al., 2016).

Infekce v oblasti genitálního ústrojí jsou považovány za možný rizikový faktor pro HPV infekci v dutině ústní. Italská studie zaměřená na ženy s cervikální infekcí zjistila prevalenci orální HPV infekce 14,3 % (14/98). Jako jediný rizikový faktor byl popsán nízký věk začátku pohlavního života. Sexuální chování (počet partnerů pro vaginální a orální pohlavní styk), ani samotná přítomnost cervikální infekce nezvyšovala riziko orální HPV infekce (Termine et al., 2011).

#### 1.2.5 Význam vakcinace

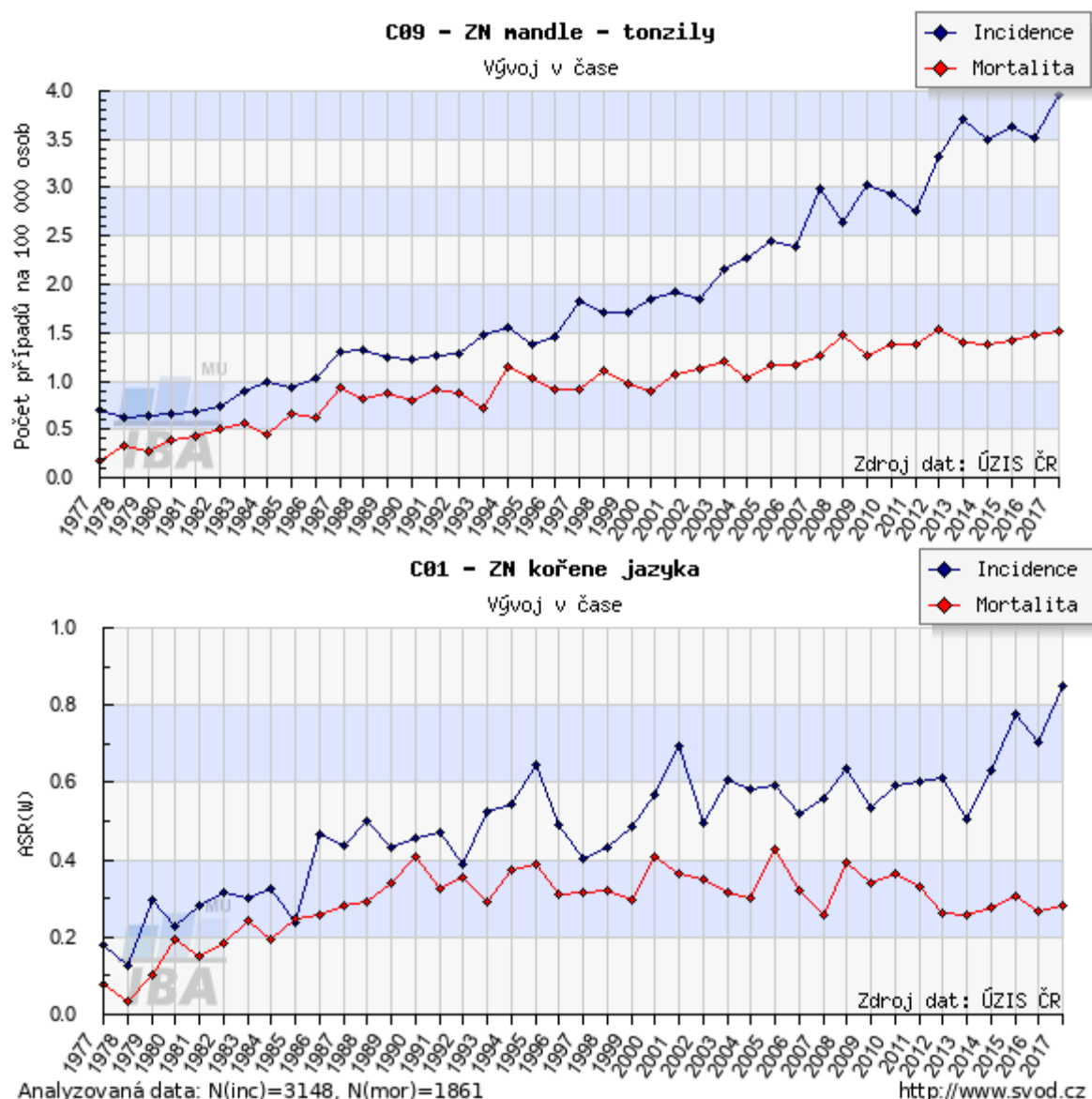
Ve Švédské studii byl pozorován účinek rutinního očkování proti HPV na orální prevalenci HPV. Před rutinním očkováním byla orální prevalence HPV 9,3 % a po naočkování 73,0 % populace byla snížena na 1,4 % (Grun et al., 2015). Klinická studie v Kostarice prokázala, že 4 roky po vakcinaci bivalentní vakcínou byla orální prevalence HPV u vakcinovaných žen o 93,3 % nižší ve srovnání s nevakcinovanými ženami (Herrero et al., 2013).

Prevenici HPV asociovaných nádorů lze provádět dvěma cestami: primární prevencí, kterou je profylaktická vakcinace proti HPV u dětí obou pohlaví a dále sekundární prevencí, což je včasná identifikace počátečních stádií onemocnění (sérologicky pozitivita protilátek proti HPV16 E6 onkoproteinům). Tato opatření by tak postupně mohla vést k eradikaci karcinomů hlavy a krku (HNC) spojených s HPV, jejichž výskyt v posledních letech rychle roste.

### **1.3 Souvislost HPV infekce s nádory orofaryngu**

HPV etiologie je popisovaná přibližně u 25 % HNC (Gillison 2000; Smith 2004). Incidence karcinomu hrtanu, který je považován za prototyp nádoru indukovaného kouřením, celosvětově klesá. Naproti tomu incidence karcinomů orofaryngu v posledních letech významně stoupá prakticky ve všech zemích, ze kterých jsou k dispozici data z onkologických registrů. V České republice stoupla za posledních 40 let incidence karcinomu tonsily a kořene jazyka téměř čtyřnásobně (obrázek 4).

Ve skupině pacientů s těmito nádory stoupá podíl nádorů asociovaných s HR HPV. Nejčastějšími typy jsou stejně jako u karcinomu děložního hrdla (KDH) typy HPV16, HPV18 a HPV33. Prudký nárůst HPV pozitivních nádorů byl pozorován nejprve v Severní Americe a, s určitým zpožděním, i v Evropě. V současnosti je prevalence těchto nádorů orofaryngu v obou regionech podobná (Mehanna, 2012). Podle některých analýz budou tyto nádory v horizontu 10 let častější než KDH, který je téměř ve 100 % asociovaný s HPV infekcí (Gillison, 2014). V rozsáhlé multicentrické studii byla přítomnost HPV DNA prokázána v 70 % případu karcinomů orofaryngu, (D'Souza, 2007). V České republice bylo na začátku tisíciletí přibližně 60 % nádorů patrových tonsil HPV pozitivních (Rotnáglová, 2011). Důvod zvyšující se incidence HPV asociovaných karcinomů orofaryngu není zcela jasný. V literatuře jsou popisovány změny sexuálního chování lidí, které by mohli mít za následek zvýšenou prevalenci orální HPV (Hammarstedt, 2007).



Obr. 4: Vývoj incidence a mortality u nádorů tonsily a kořene jazyka v České republice za posledních 40 let (zdroj: [www.svod.cz](http://www.svod.cz))

Bylo zjištěno, že pacienti s orofaryngeálním karcinomem pozitivním na HPV16, mají v porovnání s pacienty s orofaryngeálním karcinomem bez asociace s HPV16, odlišné charakteristiky. Jsou přibližně o 10 let mladší, mají méně komorbidit, jsou z vyšší socioekonomické skupiny a udávají významně nižší expozici především tabáku, ale i alkoholu.

Klinicky mají pacienti s HPV asociovanými nádory orofaryngu většinou primární nádor menšího rozsahu, s rozsáhlejším postižením uzlin v čase diagnózy, typicky se jedná o uzliny s cystickým charakterem (Gillison, 2008; Cantrell 2013). Často pozorována menší velikost primárního nádoru je jedním z důvodů, že až u 25-50 % pacientů s prvotní diagnózou

neznámý primární nádor, se primární ložisko nalezne v orofaryngeální oblasti. Proto se provádí tonsilektomie na straně detekce krčních metastáz u diagnózy neznámého primárního nádoru bez nalezení primárního ložiska. Mikroskopicky jsou HPV asociované karcinomy nízce diferencované. Imunohistochemicky bývá u HPV negativních nádorů detekována zvýšená exprese cyklinu D1 a p53. Naopak u HPV asociovaných karcinomů orofaryngu je vysoká exprese proteinu p16, který je pro vysokou senzitivitu a specifitu v současnosti rutinně používaným nepřímým biomarkerem virové aktivní infekce.

HPV v orální oblasti se soustřeďuje v bazálních vrstvách epitelu sliznice především tonsily a jazykové mandle. Jde o zásadní lymfatické orgány důležité pro imunitní rovnováhu oblasti hltanu. HPV účinně uniká imunitnímu systému několika mechanismy. Jeho lokalizace v bazálních vrstvách je obtížně dosažitelná buňkami imunitního systému, dalším důležitým faktorem je nepřítomnost virémie a zánětu bez aktivace antigen prezentujících buněk (Stanley, 2006). To je důvodem proč se o přítomnosti a perzistenci viru v organismu dozvíme většinou až při vzniku HPV asociovaného nádoru.

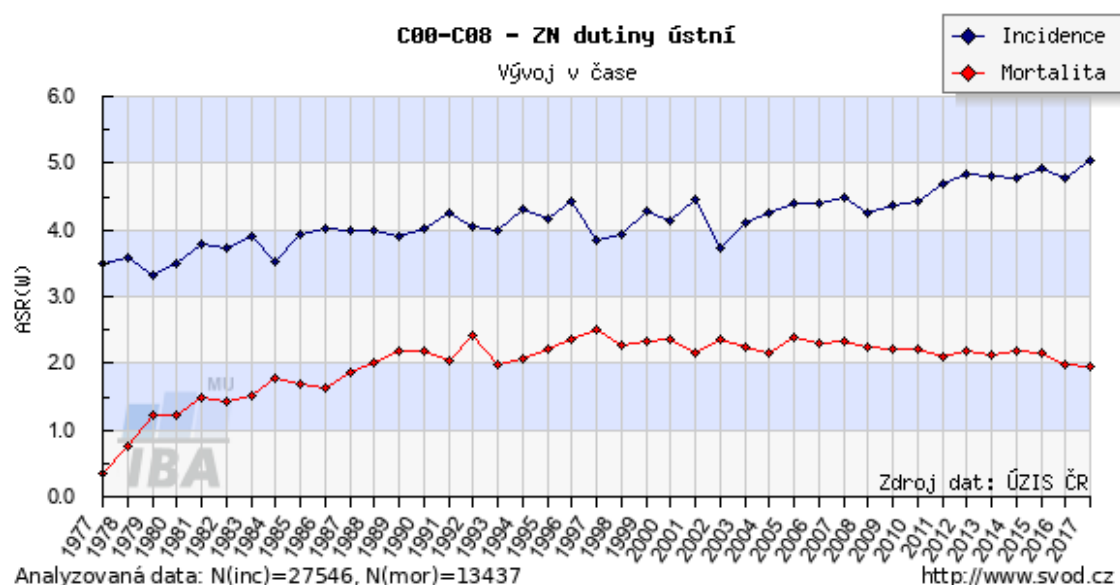
Pacienti s HPV asociovanými nádory orofaryngu mají lepší prognózu, menší procento rekurencí, vyšší senzitivitu k radioterapii a chemoterapii při porovnání s pacienty s HPV negativními nádory orofaryngu (Fakhry 2008; Worden 2008). Míra pětiletého přežití u pacientů s HPV asociovaným nádorem v pokročilém stádiu je 75–80 %, v porovnání s mírou přežití méně než 50 % u pacientů bez HPV asociace v podobném stádiu (Ang et al., 2010). Rovněž u HPV asociovaných karcinomů orofaryngu je prognostický význam postižení regionálních metastáz nižší než u karcinomů bez HPV asociace (Straetmans 2009; Klozar, 2014). Příčina lepší prognózy není zcela objasněna. Někteří udávají jako důvod odlišné spektrum genetických změn v nádorových buňkách nebo zvýšenou aktivitu imunitního systému u HPV asociovaných nádorů. Analýza v projektu The Cancer Genome Atlas (TCGA) identifikovala potenciálně molekulární biomarkery, které je možné použít na určení prognózy. Delece nebo mutace dvou proteinů, které inhibují NF- $\kappa$ B a aktivují interferon, faktor 3 spojený s TNF receptorem (TRAF3) a cylindromatozou (CYLD), byly nalezeny v 28 % HPV asociovaných karcinomech orofaryngu (Hajek et al., 2017). Přežití u pacientů s HPV-asociovanými nádory bylo lepší u těch, kde nádory nesly defekty v TRAF3 nebo CYLD, zatím co přežití HPV pozitivních pacientů bez těchto mutací bylo podobné jako přežití pacientů s HPV negativními nádory (Hajek et al., 2017).

Lepší prognóza HPV asociovaných nádorů a odlišné spektrum rizikových faktorů si vyžádalo změnu klasifikace TNM a vznik odlišné kategorizace HPV asociovaných nádorů. To je

obsaženo v 8. vydání TNM klasifikace, kterou pravidelně vydává Unie pro mezinárodní kontrolu rakoviny (The Union for International Cancer Control – UICC) a také v stagingovém manuálu American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Lydiatt, 2017).

#### 1.4 Souvislost HPV infekce s nádory dutiny ústní

Dlaždicobuněčný karcinom dutiny ústní je jedním z nejčastějších malignit horního aerodigestivního traktu. Incidence nádorů dutiny ústní v České republice je stabilní, s naznačeným mírným vzestupem v posledních 10 letech (obrázek 5).



Obr. 5: Vývoj incidence a mortality u nádorů dutiny ústní v České republice za posledních 40 let (zdroj: www.svod.cz)

Postihuje třikrát častěji muže než ženy. I přes nové možnosti onkologické léčby, se pětileté přežití pacientů pohybuje mezi 40-50 %. Hlavním rizikovým faktorem je kouření, zejména v kombinaci s konzumací alkoholu (Blot WJ, 1988).

Prognostická role HPV positivity u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní není známá (Klozar, 2019). Taký zvýšená exprese proteinu p16 nevykazuje tak významnou korelaci s HPV infekcí, jako je tomu u orofaryngeálních karcinomů (Meshman 2017).

Prevalence p16 exprese u karcinomů dutiny ústní se v publikovaných studiích liší, v Evropě je popisována prevalence v rozmezí 7 až 15,4 % (Abrahamo 2018, Dediol 2016, Gotz 2016).

Výsledky studií posuzujících vliv p16/HPV DNA positivity na přežití pacientů po léčbě karcinomu dutiny ústní jsou rovněž rozdílné. Některé udávají horší prognózu u p16/HPV DNA pozitivních pacientů (Duray 2012, Lee LA 2015, Saghravarian 2016), jiné studie

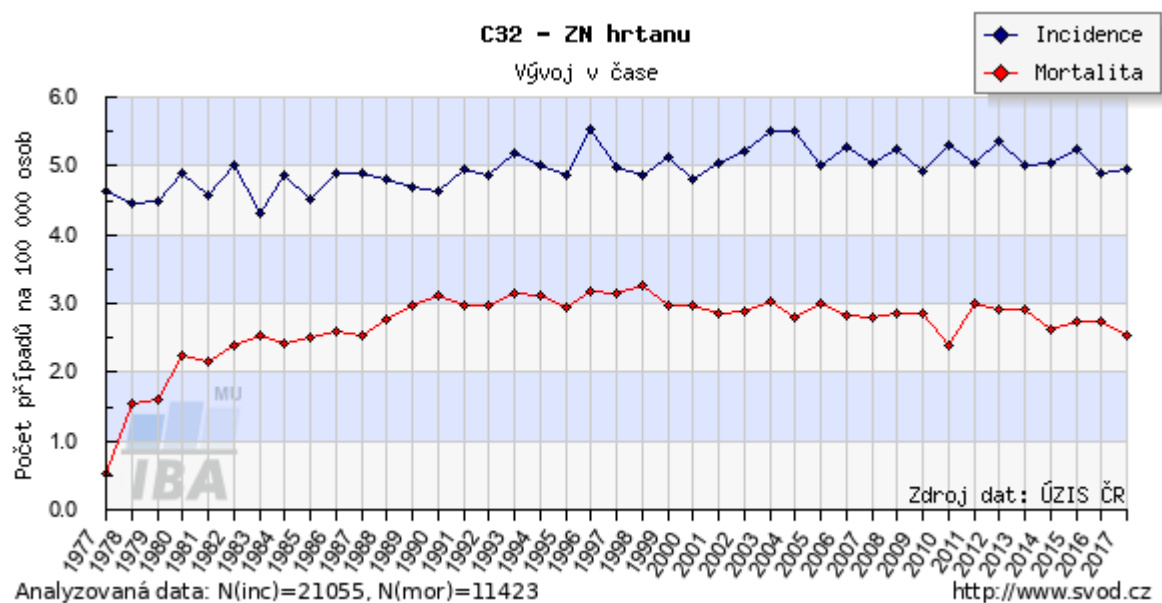


naopak popisují p16/HPV DNA pozitivitu jako faktor zlepšující prognózu pacientů s karcinomem dutiny ústní (Hoffmann 2012, Minami 2017, Satgunaseelan 2016).

### 1.5 Souvislost HPV infekce s nádory hrtanu

Dlaždicobuněčný karcinom hrtanu je třetím nejčastějším maligním nádorem v ORL oblasti. V drtivé většině postihuje muže, průměrný věk v čase diagnózy činí 60 let.

Incidence nádorů hrtanu v České republice je stabilní, s naznačeným mírným poklesem mortality v posledních 10 letech (obrázek 6).



Obr. 6: Vývoj incidence a mortality u nádorů hrtanu v České republice za posledních 40 let (zdroj: [www.svod.cz](http://www.svod.cz))

Prevalence HPV positivity u nádorů v neorofaryngeální lokalizaci podle metaanalýzy Ndiaye a kol. nekopíruje rozdíly v geografické prevalenci HPV pozorované u orofaryngeálního karcinomu. Nejvyšší incidence přítomnosti HPV DNA v karcinomu hrtanu je v Latinské Americe (32 %) a Asii (28 %), nižší je v Evropě (21 %) a Severní Americe (19 %) (Ndiaye et al., 2014). Při doplnění E6 mRNA detekce jako markeru aktivní infekce u HPV DNA pozitivních vzorků, se HPV pozitivita v oblasti hrtanu snížila na 1,5 % (Castellsague et al., 2016). Nedávná metaanalýza 2 578 případů nádorů hrtanu, uvádí 413 (16 %) bylo HPV-positivních. U této metaanalýzy nebyl pozorovaný rozdíl v celkovém 5letém přežití (OS) pacientů s HPV pozitivními nádory (Ahmadi et al., 2018). V čínské studii bylo celkové přežití

významně zlepši u HPV-pozitivních pacientů s karcinomem hrtanu ve srovnání se skupinou HPV-negativní pacientů (Tong et al., 2018).

Další otázkou je, zda u rekurentní respirační papilomatózy (RRP) hrtanu hraje HPV infekce roli při maligní transformaci. Jsou popisovány ojedinělé kazuistiky s maligní transformací RRP hrtanu. Autoři předpokládají, že příčinou je mutace p53 a integrace HPV-11 (Rady et al., 1998). Z dosud publikovaných studií však neexistují žádné důkazy o roli HPV infekce u maligní transformace hrtanových prekanceróz nebo papilomatózy. (Klozar, 2019).

## **1.6 Možnosti detekce HPV infekce**

### **1.6.1 Detekce HPV DNA**

HPV DNA lze detekovat nejčastěji pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Existuje velké množství metod. Pro přehlednost popisuji pouze metodu detekce HPV DNA použitou ve studiích, které jsou podkladem disertační práce.

Po izolaci DNA jsou použity primery cílené na úseky papilomavirového genomu (nejčastěji L1). Pokud jsou použity obecné primery, lze další typizaci provést pomocí reverzní hybridizace (RLB – reverse line blot), která umožní identifikaci 37 typů při jedné reakci. Pokud se jedná o jiný typ, který nebyl detekován reverzní hybridizací, lze použít metodu sekvenace.

Jako další z možností detekce HPV DNA je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která pro detekci využívá fluorescenčně značené próby. Tyto próby jsou kompatibilní se specifickými úseky DNA pro konkrétní typy HPV. K rutinnímu vyšetření vzorků se tato metoda nepoužívá.

### **1.6.2 Detekce HPV RNA**

Nalezení virové DNA nemusí značit aktivně probíhající infekci, neříká nic o transkripční aktivitě viru. Zlatým standardem je průkaz transkripce virových onkoproteinů pomocí detekce E6/E7 mRNA. Hlavní limitací této metody je fragilita RNA. U fixovaných tkání zalitých v parafínu často dochází k fragmentaci RNA. Právě tkáň fixovaná a zalitá v parafínu je, v případě karcinomů hlavy a krku (HNC), nejčastěji využívaná pro rutinní diagnostické účely. Metoda detekce virové RNA je nákladnější a složitější pro běžné zavedení do rutinní praxe pro tento druh klinického materiálu.

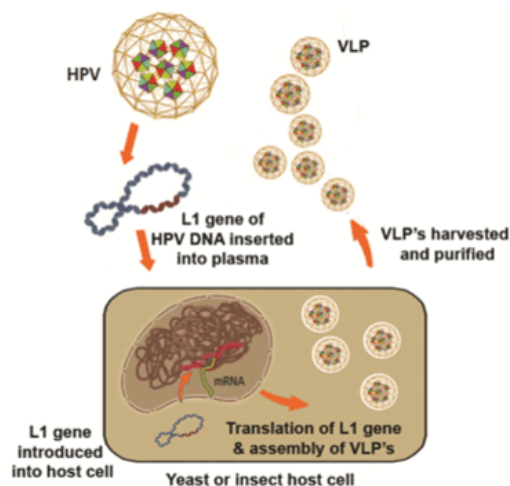
### 1.6.3 Detekce proteinu p16 a p53 pomocí imunohistochemie

Nejčastější metoda pro detekci HPV infekce u nádorů orofaryngu, která se využívá v běžné klinické praxi, je imunohistochemická detekce exprese proteinu p16INK4a (p16) (Hoffmann et al., 2012). Jedním z hlavních způsobů zásahu viru do metabolismu buňky je zablokování funkce retinoblastomového proteinu (pRb) virovým onkoproteinem E7. Následnou negativní zpětnou vazbou dochází k zvýšené expresi proteinu p16. Proto se exprese p16 považuje za nepřímý marker HPV-indukovaných dlaždicobuněčných HNC. Pro detekci HPV-asociovaného orofaryngeálního karcinomu má exprese p16 proteinu podle recentní přehledové studie s metaanalýzou sensitivitu 94 % (CI 91-97 %) a specificitu 83 % (CI 78-88 %) (Prigge et al., 2017). Jde o nejjednodušší a nejlevnější diagnostiku HPV positivity nádorů u orofaryngeální lokalizace, a proto byla také použita v nejnovější TNM klasifikaci (TNM-8), kde kategorie T a N p16 pozitivních pacientů s orofaryngeálním karcinomem jsou, při stejném rozsahu onemocnění, nižší než u p16 negativních nádorů (Lydiatt et al., 2017).

Zvýšit citlivost a specificitu lze kombinací metod imunohistochemické detekce p16 s HPV DNA detekcí pomocí PCR. Kombinace těchto dvou metod dosahuje senzitivity a specificitu průkazu aktivní infekce srovnatelnou s detekcí mRNA.

### 1.6.4 Sérologie

Metoda detekce specifických protilátek je metodou nepřímou. Odráží reakci imunitního systému na infekci. Detekce virově specifických protilátek se nejčastěji provádí pomocí enzymatické imunoanalýzy (ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay). Jako reakce na přirozenou infekci vznikají protilátky proti hlavnímu kapsidovému proteinu viru (L1) tzv. anamnestické protilátky. Pro jejich detekci se v ELISA testu používají tzv. viru podobné částice (VLP – virus-like particles), které se připravují v rekombinantních expresních systémech (bakuloviry, kvasinky). (obrázek 7)



Obr. 7: Proces vzniku viru podobné částice (převzato z publikace Parker, 2006)

Při invazivním onemocnění asociovaném s HPV infekcí se tvoří protilátky proti časným antigenům – onkoproteinům E6 a E7 HR HPV. Pro detekci virově specifických protilátek proti těmto proteinům se využívají fúzní proteiny s glutathion-S-transferázou (GST), připravované v bakteriálním expresním systému.

### 1.7 Význam HPV specifických protilátek k stanovení prognózy

Protilátky specifické pro virové onkoproteiny HPV16 E6 a E7 jsou vzácně přítomny u zdravých jedinců, ale jejich prevalence je typicky vysoká u pacientů s invazivními maligními nádory (Zumbach et al., 2000). Několik studií ukázalo, že u pacientů s karcinomem děložního hrdla, se hladiny protilátek proti virovým onkoproteinům po léčbě snižují a tento pokles je spojen s lepší prognózou (Baay et al., 1999, Di Lonardo et al., 1998). Pouze šest studií analyzovalo přetrvávání HPV-specifických protilátek u pacientů s HNC po léčbě. Ve studii Košlabová a kol. hladina protilátek specifických pro HPV16 E6 / E7 klesala již měsíc po ukončení léčby, protilátky specifické pro kapsidové proteiny zůstaly stabilní i po roce (Košlabova et al., 2013). Podobné výsledky byly pozorovány v jiných studiích (Zhang et al., 2017, Fakhry et al., 2016, Rubenstein et al., 2011), zatímco Lang Kuhs a kol. (Lang Kuhs et al., 2017) nepozoroval pokles hladin protilátek HPV16 E6 po ukončení léčby. Spector a kol. (Spector et al., 2017) zjistili signifikantně vyšší hladiny protilátek HPV16 E6 / E7 u pacientů s recidivou nádorů, a naopak častější pokles protilátek HPV16 E7 u pacientů bez recidiv během sledování.

Ve všech dosavadních studiích byla doba pozorování krátká, rychlost poklesu protilátek specifických pro HPV16 E6 / E7 u pacientů po léčbě nebyla zkoumána při delším sledování.

Recentně bylo také zjištěno, že u pacientů s orofaryngeálním karcinomem jsou protilátky HPV16 E6 / E7 přítomny mnoho let před diagnózou, proto je zajímavé analyzovat změny hladin protilátek během delšího sledování (Kreimer, 2014, Kreimer et al., 2017).

## 2. CÍLE PRÁCE

Předkládaná disertační práce měla následující cíle:

### *Cíl I:*

Dosavadní poznatky o prevalenci orální HPV infekce v populaci jsou značně diskrepantní a data ze střední Evropy nejsou k dispozici. Porovnání výsledků je obtížné i pro rozdílnou použitou metodiku. Informace o prevalenci HPV ve zdravé populaci nám pomůže zaměřit se na prevenci HPV asociovaných nádorů.

1. Zjistit prevalenci HPV v buňkách z orálních výplachů a HPV specifických protilátek u zdravé populace ve věku 20 až 35 let
2. Zjistit souvislost HPV positivity s parametry demografickými a s parametry sexuálního chování
3. Porovnat soubor věkové skupiny 20 až 35 let s kontrolním souborem probandů ve věku 35 až 85 let

### *Cíl II:*

Studie zaměřené na dynamiku protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 u karcinomu děložního hrdla potvrdily, že pokles protilátek ukazuje na lepší prognózu pacientů. Studií zaměřených na dynamiku HPV specifických protilátek u karcinomů hlavy a krku je málo a doba sledování je krátká.

4. Sledovat dynamiku kapsidových (anamnestických) protilátek a protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 HR HPV v intervalu 2-14 let od ukončení léčby pacientů s karcinomem orofaryngu
5. Porovnat dynamiku protilátek u pacientů s recidivou a bez recidivy karcinomu orofaryngu

### *Cíl III:*

Prognostická role p16 positivity (HPV positivity) je u karcinomů orofaryngu významná. Další studií jsme chtěli zjistit, jakou roli hraje u anatomicky nejbližší lokality – u karcinomů dutiny ústní.

6. Zjistit prevalenci p16 pozitivních karcinomů dutiny ústní
7. Analyzovat prognostické faktory karcinomů dutiny ústní 5 let od ukončení léčby
8. Zjistit jakou roli v prognóze dlaždícobuněčných karcinomů dutiny ústní hraje p16 pozitivita

Cíle byly stanoveny na základě těchto hypotéz:

Cíl I:

H1. Prevalence orální HPV u zdravé částečně očkované populace bude nižší než prevalence neočkované populace "

H2. Prevalence HPV positivity souvisí s faktory sexuálního chování

H3. Prevalence orální HPV stoupá s věkem

Cíl II:

H4. Protilátky proti onkoproteinům E6 a E7 HR HPV klesají s dobou od ukončení léčby, kapsidové (anamnestické) protilátky si drží stabilní hodnotu i při dlouhodobém sledování

H5. Protilátky proti onkoproteinům E6 a E7 si u pacientů s recidivou základního onemocnění udržují vysokou hodnotu

Cíl III:

H6. Prevalence p16 pozitivních karcinomů dutiny ústní je nižší než prevalence p16 pozitivních karcinomů orofaryngu

H7. Nejvýznamnějším prognostickým faktorem lokálně pokročilých karcinomů dutiny ústní je postižení krčních uzlin

H8. Zvýšená exprese proteinu p16 nemá prognostický význam u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní

### **3. MATERIÁL A METODIKA**

#### **3.1 Cíl I – Prevalence a rizikové faktory orální HPV infekce u zdravé populace**

##### **3.1.1 Charakteristika souboru pacientů a dotazníky**

Byly hodnoceny dvě skupiny zdravých účastníků. Do souboru I bylo zařazeno v období od září 2015 do prosince 2017 294 studentů medicíny středoevropského regionu ve věku 20 až 35 let s průměrným věkem 23,2 let. Vylučovacím kritériem byla anamnéza HNC nebo karcinomu děložního hrdla (KDH). Od všech studentů byl odebrán vzorek výplachu dutiny ústní. Od studentů, kteří nebyli očkováni, byl odebrán i vzorek krve. Každému účastníkovi bylo přiděleno jedinečné identifikační číslo a byli tak anonymizováni. Toto identifikační číslo bylo použito pro označení příslušných orálních výplachů, vzorků krve a dotazníku. Cíl studie byl studentům vysvětlen a všichni účastníci podepsali informovaný souhlas. Studii schválila nemocniční etická komise. Soubor II byl složen z 215 jedinců ve věku 35 až 85 let s průměrným věkem 55,7 let, kterým byl materiál odebírán v rámci předchozích studií našeho výzkumného týmu (Tachezy et al., 2009). Žádný z jedinců ze souboru II nebyl očkován, protože vzorky byly odebrány v letech 2000 až 2010, což je období, kdy vakcíny proti HPV v Evropské unii nebyly schváleny nebo běžně aplikovány. Informace o jejich orální HPV DNA pozitivitě a séropozitivitě byly také získány z předchozích studií, přičemž čtyři vzorky nebyly k dispozici pro sérologickou analýzu.

Dotazníky: Všichni účastníci souboru I byli požádáni, aby vyplnili anonymizovaný online dotazník zahrnující údaje o věku, sexuálním chování, vzdělání, stavu očkování proti HPV (typ vakcíny, první dávka ve vztahu k začátku sexuálního života), historii tonzilektomie, anamnézu piercingu do jazyka nebo rtů, způsob porodu, užívání tabáku, alkoholu a drog. Další otázky se týkaly sexuálního chování, konkrétně: sexuální orientace, věku při prvním pohlavním styku, počtu partnerů, se kterými se líbali ústa na ústa, počtu partnerů, se kterými měli vaginální a orální sex celkem za dobu jejich života a za posledních 12 měsíců, frekvence používání kondomu při vaginálním styku, a dřívější nebo současné genitální infekce (obrázek 8). Z 388 zapsaných studentů, kterým byli odebrány vzorky, správně vyplnilo dotazník 294 a bylo dále hodnoceno.

Dotazník použitý pro soubor II, použitý v rámci předchozí studie (Tachezy et al., 2009), se zcela nepřekrýval s nově vytvořeným dotazníkem, a proto jen část dat mohla být využita pro účely porovnání.



1. Číselný kód odebírané vzorky:
2. Věk:
3. Pohlaví: ☐ ženské ☐ mužské
4. Stupeň dosaženého nebo současného vzdělání: ☐ základní ☐ středoškolské ☐ vysokoškolské  
☐ student
5. Kouření cigaret: ☐ Nekuřák (méně než 100 cigaret za život) ☐ Bývalý kuřák ☐ v současnosti kuřák
6. Počet let, po které kouřím, nebo jsem kouřil/a:
7. V letech, kdy jsem kouřil jsem průměrně vykouřil: ☐ Méně než 20 balíčků (po 20 cigaretách) /rok  
☐ 1-2 balíčky /týden ☐ 1 balíček / den ☐ 2 a více balíčků/ den
8. Konzumace alkoholu: ☐ abstinent ☐ v průměru 1-2krát týdně ☐ téměř denně
9. Množství alkoholu během typické konzumace: ☐ abstinent ☐ většinou 1-2 jednotky (= 0,5 l piva nebo 2 dcl vína nebo 0,5 dcl destilátu) ☐ 3 a více jednotek
10. Užívání marihuany: ☐ nikdy jsem jí neměl/ vyzkoušel jsem to 1-2krát během života  
☐ v minulosti jsem jí užíval (v posledním roce jsem marihuanu neužíval) ☐ méně než 1x měsíčně ☐ 1x týdně a více
11. Vaše sexuální orientace: ☐ heterosexuál ☐ homosexuál ☐ bisexuál ☐ asexuál
12. Počet partneru na francouzské líbaní během života: ☐ 1-4 ☐ 5-10 ☐ 11-30 ☐ víc než 30
13. Počet partneru na francouzské líbaní v posledních 12 měsících: ☐ 1 ☐ 2-5 ☐ 6-10  
☐ víc než 10
14. Váš věk při prvním sexuálním styku:
15. Počet sexuálních partnerů za celkově (vaginální sex): ☐ žádný ☐ 1-2 ☐ 3-5 ☐ 6-10 ☐ 11-20  
☒ 21 a víc
16. Počet sexuálních partnerů (vaginální sex) v posledních 12 měsících: ☐ žádný o 1-2 ☐ 3 a víc
17. Používání kondomu při vaginálním sexu: ☐ vždy ☐ většinou ☐ někdy ☐ nikdy
18. Počet partnerů, s nimiž jsem měl/a orální sex celkově: ☐ žádný ☐ 1-5 ☐ 6-10 ☐ 11-20 ☐ 21 a více
19. Počet partnerů s nimiž jsem měl/a orální sex v posledních 12 měsících: ☐ Žádný ☐ 1-2 ☐ 3-4  
☐ 5 a víc
20. V minulosti jste byl léčen na sexuálně přenosné onemocnění: ☐ Ne ☐ Ano
21. Mám nebo měl/a jsem: ☐ bradavice /kondylomat na pohlavních orgánech ☐ papilomy hrtanu/ hltanu
22. Byl/a jste v minulosti očkován/a proti infekci? ☐ Ano ☐ Ne
23. Kterou vakcínou jste byl očkován: ☐ Silgard ☐ Cervarix ☐ nevím název ☐ nebyl jsem očkován
24. V případě že jste očkován, proběhlo před začátkem aktivního sexuálního života? ☐ ano ☐ ne  
☐ nevím
25. Jak často si čistíte zuby? ☐ po každém jídle ☐ 2x denně ☐ 1x denně ☐ méně než 1x denně
26. Byly vám v minulosti odstraněny mandle? ☐ ne ☐ ano – nosní ☐ ano – krční ☐ ano - nosní i krční
27. Máte, nebo jste v minulosti měl/a piercing na jazyku nebo rtu? ☐ ano ☐ ne
28. Váš porod byl: ☐ per vias naturales (porodními cestami) ☐ per sectio caesarea (císařským řezem)

Obr. 8: Anonymní online dotazník pro soubor I

### 3.1.2 HPV DNA detekce, genotypizace

Orální exfoliované buňky byly získány orálním výplachem po dobu 30 až 60 sekund pomocí 10 ml fosfátového pufru (PBS) (pH 7,4; AccuGENE, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgie). Vzorky byly centrifugovány po dobu 7 minut při otáčkách 5000 / min, pelet byl dvakrát promytý 30 ml a 10 ml PBS a buňky byly resuspendovány v 5 ml PBS. DNA pro detekci HPV byla extrahována pomocí Puregene Core Kit B (Gentra Qiagen, Hilden, Německo), podle protokolu výrobce, a rozpuštěna v 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 do konečné koncentrace 50 ng /  $\mu$ l. Pro kontrolu integrity DNA byl amplifikován fragment lidského beta-globinu o délce 110 parů bází (Tachezy et al., 2005).

HPV DNA detekce a genotypizace byly prováděny pomocí PCR za použití širokospektrálních GP5 + a 5'-koncových biotinem značených GP6 + (BSGP5 + / 6 + bio) primerů, specifických pro region L1, a metodou reverzní hybridizace (RLB), která je schopna identifikovat 37 různých typů HPV při jediném testování, jak již bylo popsáno (Tachezy et al., 2013).

Produkty PCR, u kterých nebylo možné určit typizaci pomocí reverzní hybridizace, byly purifikovány z 2 % agaróзовého gelu (NuSieve GTG agaróza, FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) pomocí soupravy pro extrakci z gelu MinElute (Qiagene, Hilden, Německo) a sekvenovány k určení přesného genotypu HPV pomocí soupravy BigDye Terminator Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Analýza byla provedena na automatizovaném systému ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Výsledky byly analyzovány softwarem Chromas a zadány do BLAST® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Tachezy et al., 2013).

### 3.1.3 Sérologické vyšetření

Od každého pacienta bylo odebráno pět mililitrů krve. Sérum bylo separováno odstředěním při 3000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, poté rozděleno na alikvoty a uskladněno při -20 °C.

Přítomnost protilátek proti virově specifickým antigenům byla testována pomocí in-house metody ELISA (Parker et al., 2006). Pro detekci protilátek proti virovým kapsidovým proteinům jsme použili viru podobné částice složené z L1 proteinu (VLP), odvozené od HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58, které byly připraveny v rekombinantním bakulovirovém expresním systému (Frayne et al., 2006). Protilátky proti HPV16 E6 a E7

onkoproteinům byly detekovány pomocí fúzních proteinů s glutathion-S-transfrázou (Sehr et al., 2001).

Jamky mikrotitračních destiček (Polysorp NUNC immunoplate, Thermo Fisher Scientific, Dánsko) byly potaženy virově-specifickými antigeny 2 hod při teplotě 37 °C a přes noc při 4 °C (VLP) nebo přes noc při 4 °C (GST antigeny). Všechny další inkubace 1 hod při 37 °C byly vždy následovány pětinasobným promytím jamek. Potenciálně volná vazebná místa jamek byla vysycena BSA (VLP) nebo netučným mlékem (GST) a poté byly jamky inkubovány s testovanými vzorky, ředěnými 1:25 (VLP) nebo 1:50 (GST) v paralelách. Navázané protilátky byly označeny oslím imunoglobulinem proti lidskému IgG (H a L řetězec), konjugovaným s křenovou peroxidázou (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, USA), barevná reakce byla vyvolána o-fenylendiaminem (VLP) nebo tetramethylbenzidinem (GST) a vyhodnocena spektrofotometricky (Infinite 200 microplate reader, TECAN, Švýcarsko). Pro zjištění reaktivity pozadí byla stejná séra vyšetřena na mikrotitrační destičce bez antigenu (pouze BSA – VLP nebo GST – GST fúzní proteiny). Na každé destičce byla vždy zařazena standardní pozitivní a negativní kontrola proti danému antigenu. Od hodnoty OD (optical density - optické hustoty) séra, získané na mikrotitrační destičce s virově-specifickým antigenem, byla odečtena hodnota OD stejného séra na destičce kontrolní. Pro každý antigen a destičku byla vypočtena hraniční hodnota (cut-off, CO) jako aritmetický průměr rozdílů OD plus 2/3 směrodatné odchylky (VLP/GST), séra s rozdílem OD vyšším, než hodnota spočtená byla vyloučena a proceduru jsme opakovali tak dlouho, až hodnota rozdílu OD žádného ze zbývajících vzorků nebyla vyšší. Všechny výsledky testů ELISA byly vyjádřeny jako tzv. OD index (podíl mezi rozdílem OD daného séra a hodnotou CO), který do určité míry ukazuje sílu protilátkové odpovědi. Testovaná séra s OD indexem vyšším než 1 jsme označili jako pozitivní. Pro konfirmaci výsledků jsme všechny vzorky s OD indexem do 10 % nad hodnotou CO znovu testovali a jako pozitivní označili ty, které byly pozitivní opakovaně. V případě nesouhlasných výsledků mezi prvními dvěma měřeními byl vzorek testován potřetí, konečný výsledek odpovídal dvěma souhlasným ze tří.

Pro kontrolu jsme opakovaně testovali také čtvrtinu vzorků z celého souboru.

#### 3.1.4 Statistická analýza

T-test a Fisherův test byly použity k vyhodnocení rozdílů mezi skupinami HPV-pozitivních a HPV-negativních. Úroveň významnosti byla stanovena na 5 %. Statistiky byly vypočteny v R

verzi 3.3 Core Team. Data jsou uvedena jako procenta nebo průměr  $\pm$  standardní odchylky (SD).

### **3.2 Cíl II – Prognostický význam HPV-specifických protilátek po léčbě u pacientů s nádory orofaryngu**

#### **3.2.1 Charakteristika souboru pacientů**

V této studii byla analyzována séra pacientů s diagnózou dlaždicobuněčného karcinomu orofaryngu (ICD-10: C9–10), kteří byli léčeni na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole v období 2001–2013. Všichni pacienti před zařazením do studie podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválená nemocniční etickou komisí. Před zahájením léčby byla odebrána krev. V této studii jsme hodnotili vzorky 133 pacientů s diagnózou dlaždicobuněčného karcinomu orofaryngu, kteří měli pozitivní séra na přítomnost protilátek proti HPV16 E6 a / nebo E7 před zahájením léčby. Z těchto 133 pacientů bylo 88,7 % (118/133) HPV DNA pozitivních a 11,3 % (15/133) HPV DNA negativních.

U 93 z těchto 133 pacientů bylo k dispozici kontrolní odběr po roce od ukončení léčby. Kromě toho jsme v roce 2015 pozvali těchto 93 pacientů na další vyšetření a odběr krve. Celkem 58 pacientů přišlo k dalšímu odběru vzorků krve, šestnáct bylo mrtvých, devět nereagovalo na naši výzvu (v centrálním registru pojištěných osob figurovali jako žijící pojištěnci) a devět se odmítlo zúčastnit studie. Všechny demografické a klinické údaje o 133 pacientech jsou uvedeny v tabulce č. 2. V kohortě 93 pacientů bylo během prvního roku sledování detekováno 5 recidiv. Ve skupině 58 pacientů s odběrem vzorků 2 až 14 let po léčbě byly zjištěny dvě duplicity.

Tab. 2: Demografické a epidemiologické charakteristiky souboru pacientů ze Studie II

	<b>Charakteristika</b>	<b>Počet (%)</b>
<b>Věk</b>	průměrný věk	59
	≤55	42 (31,6)
	>55	91 (68,4)
<b>Pohlaví</b>	ženy	30 (22,5)
	muži	103 (77,5)
<b>Počet sexuálních partnerů</b>	<6	53 (39,8)
	≥6	80 (60,2)
<b>Kouření</b>	nekuřáci	43 (32,3)
	kuřáci nebo bývalí kuřáci	90 (67,7)
<b>Alkohol</b>	Ne	46 (34,6)
	Ano	87 (65,4)
<b>Velikost primárního nádoru</b>	T1 + T2	104 (78,2)
	T3 + T4	29 (21,8)
<b>Postižení uzlin</b>	N0	32 (24,0)
	N1-3	101 (76,0)
<b>Staging nádoru</b>	I + II	29 (21,8)
	III + IV	104 (78,2)
<b>Grading nádoru</b>	G1 + G2	77 (57,9)
	G3	56 (42,1)

### 3.2.2 Serologické vyšetření

Viz 3.1.3.

Všechny vzorky séra jednoho pacienta byly testovány na jedné destičce. Konverze ze séropozitivity na séronegativitu byla definována poklesem OD indexu pod cut-off hodnotu (index OD = 1).

### 3.2.3 Statistická analýza

Pro odhad změny průměrných hodnot HPV specifických protilátek v průběhu sledovaného období byly použity zobecněné odhadovací rovnice (generalized estimating equations - GEE) s korelační strukturou. Pro analýzu specifického přežití (DSS) a celkového přežití (OS) bylo využito Coxova modelu proporcionálních rizik. Modely zahrnovaly ukazatele poklesu hladiny specifických protilátek s přihlédnutím na věk pacienta. Předpoklad proporcionality byl potvrzen Grambschovým a Therneauovým testem. Grafické znázornění přežití u pacientů se snižující se hladinou protilátek bylo vyjádřeno pomocí Kaplan-Meierových grafů.

Wilcoxonův test se použil pro testování rozdílu v indexu OD počátečních hodnot hladin protilátek před zahájením terapie u pacientů s recidivami a pacientů bez nich.

Analýzy byly generovány pomocí statistického programu GraphPad Prism, verze 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA), softwaru CDC Epi Info™ (verze 7.2.1) a softwaru R (verze 3.4.0).

## 3.3 Cíl III – Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní

### 3.3.1 Charakteristika souboru pacientů

Do retrospektivní studie bylo zařazeno 120 pacientů, primárně chirurgicky léčených v období 2002–2017 pro dlaždicobuněčný karcinom dutiny ústní (tělo jazyka, spodina dutiny ústní, sliznice dutiny ústní, retromolární oblast a dásně).

Soubor zahrnuje dvě skupiny pacientů. Skupina 1 (N=31) je skupina pacientů operovaných v období 2002-2012, jejichž data a vzorky biologického materiálu byly prospektivně odebrány v rámci předchozích projektů našeho výzkumného týmu (Koslabova et al., 2013, Rotnaglova et al., 2011). V tomto souboru byla již provedena detekce HPV DNA a taky imunohistochemická detekce proteinu p16. Skupina 2 (N=89) je skupina pacientů operovaných v období 2013-2017, u kterých byl k dispozici pouze výsledek imunohistochemického vyšetření p16 proteinu. Obě skupiny byly srovnatelné, co do klinicko-patologických parametrů (pohlaví, věk, anatomická lokalizace, kuřáctví, T a N status).

Muži tvořili 77,5 % a ženy 22,5 % souboru s věkovým rozmezím 32-87 let s průměrným věkem 59,2 (medián věku 60 let).

V souboru bylo 56,8 % pacientů současnými kuřáci cigaret, 22,5 % bývalí kuřáci a 20,7 % nekuřáci. Od 7,5 % pacientů nebyl údaj o kouření dostupný v anamnestických datech. Alkohol pravidelně konzumovalo 37,0 % pacientů, 63,0 % pacientů alkohol nepilo vůbec nebo jen příležitostně. Od 7,5 % pacientů se tuto informaci nepodařilo zpětně dohledat.

Soubor zahrnoval 47,2 % nádorů těla jazyka (C02), 32,0 % nádorů spodiny dutiny ústní (C04), 14,4 % nádorů lokalizovaných v jiných částech dutiny ústní (C06) a 6,4 % nádorů v retromolární oblasti (C062) nebo v oblasti dásně (C03).

Podle rozsahu onemocnění, převažovali pacienti s nádory pT1 (42,5 %) a pT2 (43,3 %). Postižení uzlin nádorem (pN+) bylo přítomno u 47,5 % pacientů.

Adjuvantní radioterapie byla provedena u 67,5 % pacientů v souboru. Ze skupiny pacientů po radioterapii 21,8 % podstoupilo konkomitantní chemoradioterapii.

Perineurální šíření nádoru bylo přítomné u 40,5 % pacientů. Hodnocení extrakapsulárního šíření bylo k dispozici u 85/120 pacientů (70,5 %) a pozitivně popsáno u 24,7 %. U pacientů operovaných před rokem 2013, nebylo možné data o extrakapsulárním šíření retrospektivně dohledat.

V průběhu sledování byla recidiva u 30,0 % pacientů a nádorová duplicita popsána u 8,3 % pacientů. Všechny klinicko-patologické parametry jsou uvedeny v Tabulce 3.

### 3.3.2 Imunohistochemie, HPV DNA detekce a genotypizace

Expres p16 byla stanovena pomocí imunohistochemie v nádorové tkáni protilátkou p16INK4a (Purified Mouse) Anti-Human p16, Clone G175-405, BD, v ředění 1:100 (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Jako pozitivní kontroly byly použité dysplastické cervikální epitelové buňky. Vyhodnocení je semikvantitativní, pomocí procentuálního podílu obarvených buněk a intenzity zbarvení (dělení od + až po +++). Dále byla hodnocena lokalizace exprese (cytoplazmatická, jaderná) a intenzita zbarvení. Jako pozitivní jsou hodnoceny nádory, které vykazují střední a vyšší intenzitu barvení (++, +++) a jadernou i cytoplazmatickou pozitivitu, a to minimálně v 70 % nádorových buněk.

Expres v nižším procentu nádorových buněk, nižší intenzita, případně pouze cytoplazmatická pozitivita s jadernou negativitou, se dle doporučení College of American Pathologists (CAP) hodnotí jako negativní (Lewis et al., 2018).

HPV DNA detekce a genotypizace byly prováděny identickou metodikou, jak je popsáno ve Studii I (kapitola 3.1.2).

Tab. 3: Klinicko-patologické parametry souboru pacientů Studie III

Klinicko-patologické Parametry		Počet	
		N	%
Věk v čase dg.	≤60	63	52,5
	>60	57	47,5
Pohlaví	muž	93	77,5
	žena	27	22,5
Kouření *	kuřák	63	56,8
	bývalý kuřák	25	22,5
	nekuřák	23	20,7
Alkohol *	ano	41	37,0
	ne	70	63,0
Anatomická lokalizace **	tělo jazyka	59	47,2
	spodina dutiny ústní	40	32,0
	dáseň a retromolární oblast	8	6,4
	jiné části dutiny ústní	18	14,4
pT	pT1	51	42,5
	pT2	52	43,3
	pT3	12	10,0
	pT4	5	4,2
pN	N0	63	52,5
	N+	57	47,5
Grading *	G1	24	20,9
	G2	77	67,0
	G3	14	12,1
Adjuvantní radioterapie	ne	39	32,5
	ano	81	67,5
Recidiva	ne	84	70,0
	ano	36	30,0
Perineurální šíření *	ne	50	59,5
	ano	34	40,5
Extrakapsulární šíření *	ne	64	75,3
	ano	21	24,7
Stav při kontrole po 5 letech	žije	59	49,2
	zemřel	61	50,8

\* některá data se retrospektivně nepodařilo dohledat

\*\* některé primární nádory měly více anatomických lokalizací

### 3.3.3 Statistická analýza

Ke statistickému zpracování výsledků byl použitý program IBM SPSS verze 22.0. Pro popis souboru byly zvoleny metody deskriptivní statistiky, Fisherův přesný test a Pearsonův chí-kvadrát test. K hodnocení 5letého přežití od ukončení léčby bez známek nádoru (DSS) a celkového přežití (OS) byla použita Kaplan-Meierova metoda a ve vztahu k různým faktorům Log rank test (Mantel-Coxova metoda). Pro hodnocení statistické významnosti byla zvolena



hodnota  $p \leq 0,05$ . Metodou Coxova modelu proporcionálních rizik, byly v zařazených proměnných spočítané: signifikance, hazard ratio (HR – změna rizika exitu při jednotkové změně nezávislé proměnné) a 95 % intervaly spolehlivosti HR.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Cíl I – Prevalence a rizikové faktory orální HPV infekce u zdravé populace

*Demografické charakteristiky:* Do souboru I bylo zařazeno 294 z 388 odebraných dobrovolníků (míra spolupráce: 76 % dobrovolníků správně vyplnilo dotazník a bylo zařazeno do studie). Průměrný věk účastníků ze souboru I byl  $23,20 \pm 1,24$  let a většina z nich byly ženy (71,4 %), nekuřáci (75,2 %), pravidelní uživatelé alkoholu (64,0 %) a nevakcinovaní HPV (59,4 %). Vakcinovaní studenti ( $n = 119$ ) byli nejčastěji vakcinováni tetraivalentní vakcínou 39,5 % (47/119), bivalentní vakcínou 24,4 % (29/119) nebo si již nepamatovali typ vakcíny 36,1 % (43/119). V souboru II ( $n = 215$ ) byl průměrný věk  $55,70 \pm 10,63$  let. Většina účastníků byli muži (69,3 %) a kuřáci (61,4 %) a o něco více než polovina účastníků byla pravidelnými konzumenty alkoholu (51,2 %). Žádný dobrovolník ze souboru II nebyl vakcinován. Charakteristiky studované populace jsou shrnuty v tabulce 4.

Tab. 4: Demografické a virologické charakteristiky zkoumané populace

Charakteristiky		Soubor I (n=294), n (%)	Soubor II (n=215), n (%)
věk, průměr ±SD		23,24±1,24	55,67±10,63
Pohlaví	Ženské	210 (71,4)	66 (30,7)
	Mužské	84 (28,6)	149 (69,3)
Kouření	Nekuřák	221 (75,2)	83 (38,6)
	kuřák nebo bývalý kuřák	73 (24,8)	132 (61,4)
Alkohol	Ne	106 (36,0)	105 (48,8)
	Ano	188 (64,0)	110 (51,2)
Marihuana <sup>1</sup>	Ne	235 (79,9)	NA
	Ano	58 (19,7)	
HPV vakcinace <sup>1</sup>	Ne	174 (59,4)	NA
	ano – bivalentní	29 (9,9)	
	ano – tetravalentní	47 (16,0)	
	ano – není informace o typu	43 (14,7)	
Tonzilektomie	Ne	272 (92,5)	NA
	Ano	22 (7,5)	
Piercing jazyka <sup>2</sup>	Ne	283 (96,3)	NA
	Ano	9 (3,1)	
Způsob porodu	císařský řez	24 (8,2)	NA
	Vaginální	181 (61,6)	
	není informace	89 (30,3)	
Seropozitivita na jakýkoliv typ HPV <sup>3</sup>	ano	107/168 (63,7)	130/211 (61,6)
Orální HPV-pozitivita (jakýkoliv typ)	Ano	6 (2,0)	19 (8,8)
	Typy	16, 30, 44, 45, 54, 59	11, 16, 18, 33, 39, 45, 51, 56, 58, 61, 70, 118
Orální HR HPV-pozitivita	Ano	3 (1,0)	15 (7,0)
Orální LR HPV-pozitivita	Ano	3 (1,0)	4 (1,9)

(Procenta nedosahují 100 % kvůli chybějícím datům: <sup>1</sup> data chybí pro 1 účastníka v souboru I  
<sup>2</sup> data chybí pro 2 účastníky v souboru I; <sup>3</sup> Vzorky pro sérologické testování nebyly k dispozici u 6 účastníků v soboru I (ze 174 nevakcinovaných) a čtyři účastníky v souboru II;  
SD – standardní odchylka; NA – není k dispozici)

*Charakteristiky sexuálního chování:* V souboru I měla většina účastníků heterosexuální orientaci (96,3 %). Šest účastníků byli muži, kteří měli sex pouze s muži, a pět byli ženy, které měly sex s muži a ženami. Průměrný věk při prvním pohlavním styku byl  $17,30 \pm 1,97$  let. Většina měla celkem za život 1 až 5 vaginálních sexuálních partnerů (67,7 %) a 1 až 2 partnery pro orální sex (46,3 %). Pouze 11,9 % účastníků používalo kondom pro každý pohlavní styk a 9,2 % připustilo, že v minulosti mělo pohlavně přenosnou nemoc. Charakteristiky dostupné pro soubor II byly omezeny na počet vaginálních sexuálních partnerů, což bylo nejčastěji mezi 1 a 5 partnerů u 58,6 % účastníků. Žádného sexuálního partnera uvedli 2 účastníci (0,9 %) a více než 5 sexuálních partnerů mělo 37,7 % účastníků. Charakteristiky sexuálního chování obou souborů jsou shrnuty v tabulce 5.

Tab. 5: Charakteristiky sexuálního chování

Charakteristiky			Soubor I	Soubor II
Sexuální orientace		heterosexuál	283/294 (96,3 %)	NA
		homosexuál	6/294 (2,0 %)	
		bisexuál	5/294 (1,7 %)	
Počet partnerů na francouzské líbání	během celého života <sup>1</sup>	1-5	92/294 (31,3 %)	NA
		5-10	74/294 (25,2 %)	
		10-30	96/294 (32,7 %)	
		více než 30	26/294 (8,6 %)	
	posledních 12 měsíců <sup>2</sup>	1	178/294 (60,5 %)	
		≥2	113/294 (38,4 %)	
Věk při prvním sexuálním styku		průměr (SD)	17,3 (1,97)	NA
Počet partnerů (vaginální sex)	celoživotně	žádný	16/294 (5,4 %)	2/215 (0,9 %)
		1-5	199/294 (67,7 %)	126/215 (58,6%)
		≥6	79/294 (26,9 %)	81/215 (37,7%)
	posledních 12 měsíců	žádný	30/294 (10,2 %)	NA
		1	187/294 (63,6 %)	
		≥2	77/294 (26,2 %)	
Používání kondomů <sup>3</sup>		vždy	35/294 (11,9 %)	NA
		někdy	205/294 (69,7 %)	
		nikdy	43/294 (14,6 %)	
Počet partner (orální sex)	celoživotně	žádný	22/294 (7,5 %)	NA
		1-2	136/294 (46,3 %)	
		3-5	78/294 (26,5 %)	
		≥6	58/294 (19,7 %)	
	posledních 12 měsíců	žádný	41/294 (14,0 %)	
		1	188/294 (64,0 %)	
≥2		65/294 (22,1 %)		
Sexuálně přenosné nemoci v minulosti		ne	267/294 (90,8 %)	NA
		ano	27/294 (9,2 %)	

(Procenta nedosahují 100 % kvůli chybějícím datům: <sup>1</sup>Data chybí pro 6 účastníků v souboru I;

<sup>2</sup>data chybí pro 3 účastníky v souboru I; <sup>3</sup>data chybí pro 11 účastníků v souboru I; NA – není k dispozici)

*Prevalence orální HPV infekce:* Z 294 účastníků bylo v souboru I pouze 2,0 % (6/294) pozitivních na HPV, zatímco v souboru II bylo pozitivních na HPV 8,8 % (19/215). Ve výplachu úst bylo detekováno více typů HR HPV (HPV16, 45 a 59 v souboru I a HPV16, 18, 33, 39, 45, 51, 56 a 58 v souboru II). LR HPV typy 30, 44 a 54 byly nalezeny v souboru I, zatímco typy HPV11, 61, 70 a 118 v souboru II. Demografické charakteristiky a charakteristiky sexuálního chování šesti HPV-pozitivních účastníků ze souboru I jsou shrnuty v tabulce 6.

Tab. 6: Charakteristiky účastníků s pozitivními orálními výplachy ze Souboru I

Genotyp	Pohlaví	Kouření	Věk při prvním pohlavním styku	Počet partnerů-vaginální sex (N) C*	Počet partnerů-vaginální sex (N) 12M	Použití kondomu	Počet partnerů - orální sex (N) C	Počet partnerů - orální sex (N) 12M	HPV vakcinace
LR HPV+									
HPV 30	žena	bývalý	17	≥6	≥2	vždy	≥6	≥2	ne
HPV 44	žena	ne	18	1–5	0-1	nikdy	1-2	1	ano
HPV 54	žena	ne	17	≥6	≥2	někdy	≥6	≥2	ano
HR HPV+									
HPV 16	žena	ne	15	1-5	1	někdy	3-5	1	ne
HPV 45	žena	ne	17	≥6	1	někdy	3-5	1	ano
HPV 59	žena	ne	16	1–5	1	někdy	3-5	1	ne

(N – počet; C – celkově; 12M – posledních 12 měsíců; LR – nízké rizikový typ; HR – vysoké rizikový typ)

*Prevalence HPV-specifických protilátek:* Míra séropozitivity byla v obou souborech srovnatelná ( $p = 0,758$ ); 63,7 % nevakcinovaných účastníků v souboru I ( $n = 168$ ) a 61,6 % v souboru II mělo protilátky proti jakémukoli typu HPV. Rovněž nebyl rozdíl mezi oběma soubory v prevalenci protilátek proti vakcinálním HPV typům, proti nimž je určena nonavalentní vakcína. Z nevakcinovaných studentů ze souboru I bylo 15,5 % (26/168) pozitivních na HPV16-specifické protilátky a 16,7 % (28/168) na HPV18-specifické protilátky. V souboru II byly prevalence zkoumaných protilátek srovnatelné: 16,1 % (34/211) a 18,0 % (38/211). Protilátky proti alespoň jednomu z testovaných typů HR HPV (HPV16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58) byly detekovány u 38,1 % (64/168) resp. 46,9 % (99/211) účastníků v

souborech I a II. Prevalence protilátek proti proteinům E6 a E7 byla v obou souborech velmi nízká; 1,8 % (3/168) a 3,6 % (6/174) v souboru I a 2,8 % (6/211) pro oba typy proteinů v souboru II. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi oběma soubory v prevalenci žádné z testovaných protilátek (tabulka 7).

Tab. 7: Prevalence HPV-specifických protilátek (VLP – viru podobné částice)

	Soubor I počet (%)	Soubor II počet (%)	<i>p</i> -value
jakákoliv VLP <sup>+</sup>	107/168 (63,7)	130/211 (61,6)	0,758
HR VLP <sup>+</sup> (16, 18, 31, 33, 45, 52, 58)	64/168 (38,1)	99/211 (46,9)	0,105
VLP16 <sup>+</sup>	26/168 (15,5)	34/211 (16,1)	0,978
VLP18 <sup>+</sup>	28/168 (16,7)	38/211 (18,0)	0,837
E6 <sup>+</sup>	3/168 (1,8)	6/211 (2,8)	0,740
E7 <sup>+</sup>	6/168 (3,6)	6/211 (2,8)	0,915

*Rizikové faktory spojené s orální infekcí HPV:* Dále jsme zkoumali rizikové faktory pro orální HPV infekci v souboru I, kde byly zjištěny podrobné informace o potenciálním rizikovém chování účastníků studie (tabulka 5). Žádný ze zkoumaných rizikových faktorů nebyl při porovnání účastníků HPV pozitivních a negativních v dutině ústní statisticky významný (tabulka 8). Pouze 6 jedinců bylo pozitivních ve výplachu dutiny ústní na HPV a žádný ze zvažovaných faktorů nebyl signifikantně spojen s pozitivitou HPV DNA. Multivariantní analýza nebyla provedena vzhledem k malé prevalenci orální HPV positivity. Žádný ze zkoumaných rizikových faktorů nebyl statisticky významný ani v souboru II.

Tab. 8: Statistická významnost rizikových faktorů pro orální HPV DNA pozitivitu

	orální HPV pozitivita (N=6) n (%)	orální HPV negativita (N=288) n (%)	p-value
Věk (roky), průměr (SD)	22,5 (1)	23,25 (1,24)	0,229
Pohlaví ženy muži	6 (100,0)	204 (70,8) 84 (29,2)	0,188
Kouření ano ne	1 (16,7) 5 (83,3)	72 (25,0) 216 (75,0)	1,000
Alkohol ano ne	5 (83,3) 1 (16,7)	183 (63,5) 105 (36,5)	0,424
Marihuana * ano ne	3 (50,0) 2 (33,3)	55 (19,1) 233 (80,9)	0,055
Vakcinace * ano ne	3 (50,0) 3 (50,0)	116 (40,3) 171 (59,4)	0,690
Stav po tonzilektomii ano ne	- 6 (100,0)	22 (7,7) 266 (92,4)	1,000
Piercing * ano ne	- 6 (100,0)	9 (3,1) 277 (96,2)	1,000
Způsob porodu císařský řez vaginálně nespecifikováno	2 (33,3) 2 (33,3) 2 (33,3)	22 (7,6) 179 (62,2) 87 (30,2)	0,068
Sexuální orientace heterosexuální bisexualní homosexuální	6 (100,0) - -	277 (96,2) 5 (1,7) 6 (2,1)	1,000
Věk při prvním pohlavním styku, průměr (SD)	16,67 (1,03)	17,27 (1,99)	0,221
STD v minulosti ano ne	- 6 (100,0)	27 (9,4) 261 (90,6)	1,000
Používání kondomů * nikdy někdy vždy	1 (16,7) 4 (66,7) 1 (16,7)	42 (14,6) 201 (69,8) 34 (11,8)	0,817
Počet partnerů na francouzské líbání - C* 1-5 5-10 10-30 více než 30	- 2 (33,3) 3 (50,0) 1 (16,7)	92 (31,9) 72 (25,0) 93 (32,3) 25 (8,7)	0,262
Počet partner na francouzské líbání – 12M* 1 2 a více	3 (50,0) 3 (50,0)	175 (60,8) 110 (38,2)	0,681



Počet partnerů – vaginální sex - C			
žádný	-	16 (5,6)	0,542
1-5	3 (50,0)	196 (68,1)	
≥6	3 (50,0)	76 (36,4)	
Počet partner – vaginální sex – 12M			
žádný	-	30 (10,4)	1,000
1	4 (66,7)	183 (63,5)	
≥2	2 (33,3)	75 (26,0)	
Počet partnerů – orální sex - C			
žádný	-	22 (7,7)	0,287
1-2	1 (16,7)	135 (46,9)	
3-5	3 (50)	75 (26,0)	
≥6	2 (33,3)	56 (19,4)	
Počet partner – orální sex – 12M			
žádný	-	41 (14,2)	0,701
1	4 (66,7)	184 (63,9)	
≥2	2 (33,3)	63 (21,9)	

(\* pro některé proměnné se procenta nesčítávají do 100 % kvůli chybějícím datům. Podrobnosti viz popisky k tabulkám 4 a 5; STD – sexuálně přenosné onemocnění; C – celoživotně; 12M – za posledních 12 měsíců)

## 4.2 Cíl II – Prognostický význam HPV-specifických protilátek po léčbě u pacientů s nádory orofaryngu

### 4.2.1 Změny v dynamice hladiny protilátek během prvního roku sledování

Jeden rok po ukončení léčby byly k dispozici vzorky séra od 93 z 133 pacientů, kteří byli při vstupu do studie pozitivní na protilátky anti-HPV16 E6 a / nebo E7. V době diagnózy byla v této skupině míra séropozitivity protilátek: pro HPV16 VLP 73 %, pro HPV18 VLP 32 %, pro HPV31 VLP 40 %, pro HPV33 VLP 28 %, pro HPV16 E6 96 % a pro HPV16 E7 75 %. Jeden rok po ukončení léčby byly výše zmíněné hodnoty séropozitivity vůči konkrétním protilátkám následovné: 71, 33, 38, 24, 95 a 70 %.

Rozdíl v hladinách protilátkové odpovědi (vyjádřený jako OD index, výpočet definován v kapitole 2.1.3) při zahájení léčby a při kontrolním odběru s odstupem jednoho roku od ukončení léčby byl hodnocen u protilátek specifických pro HPV16 VLP, HPV16 E6 a HPV16 E7, u kterých bylo dost subjektů pozitivních při vstupním odběru. Statisticky významná změna během prvního roku sledování byla detekována pro antigeny HPV16 E6 a E7 ( $p = 0,001$  pro oba antigeny). Podrobné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 9.

Tab. 9: Rozdíl mezi průměrným OD indexem u HPV-specifických protilátek před zahájením léčby a při kontrolním odběru 1 rok po ukončení léčby

Antigen	Všichni				bez recidivy				s recidivou				p-value - rozdíl v OD mezi pacienty s recidivou a bez recidivy
	N	průměrné OD při vstupu	průměrné OD 1 rok po léčbě	změny v OD (p-value)	N	průměrné OD při vstupu	průměrné OD 1 rok po léčbě	změny v OD (p-value)	N	průměrné OD při vstupu	průměrné OD 1 rok po léčbě	změny v OD (p-value)	
HPV 16 VLP	68	3,790	3,641	-0,149 (0,094)	64	3,824	3,688	-0,136 (0,137)	4	3,250	2,890	-0,360 (0,316)	0,546
HPV 16 E6	90	6,369	5,405	-0,964 (<0,001)	85	6,256	5,279	-0,977 (<0,001)	5	8,294	7,540	-0,754 (0,309)	0,768
HPV 16 E7	70	6,625	4,835	-1,790 (<0,001)	65	6,654	4,795	-1,859 (<0,001)	5	6,250	5,350	-0,900 (0,025)	0,035

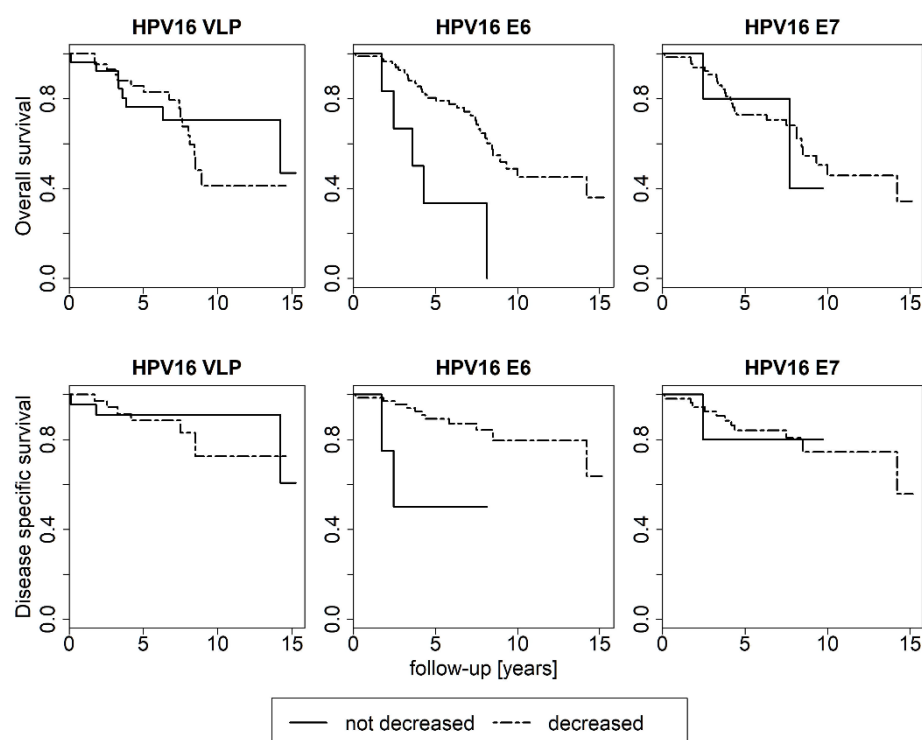
Ve skupině pacientů bez recidiv bylo pozorováno snížení hladin protilátek u všech testovaných antigenů, ale pouze u HPV16 E6 ( $p < 0.001$ ) a HPV16 E7 ( $p < 0.001$ ) byly rozdíly statisticky významné. Ve skupině pacientů s recidivami se hladiny protilátek také snížily u všech testovaných antigenů, ale pokles byl statisticky významný pouze pro HPV16 E7 ( $p = 0,025$ ). Taký rozdíl v OD indexu mezi pacienty s recidivou a bez recidivy byl pro HPV16 E7 statisticky významný ( $p = 0,035$ ).

Vliv, jaký měla dynamika hladiny protilátek detekovaných jeden rok po léčbě na přežití byl testován pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik upraveného podle věku. Žádná z testovaných HPV-specifických protilátek nebyla prognostickým faktorem pro celkové ani specifické přežití pacienta (pro specifické přežití – DSS bylo p-value 0,478 až 0,946; pro celkové přežití – OS bylo p-value 0,145 až 0,833), s výjimkou pro HPV16 E6 specifické protilátky (pro OS bylo p-value = 0,006; pro DSS bylo p-value = 0,026), (tabulka 10, obrázek 9).

Tab. 10: Prognostická hodnota změn hladiny HPV-specifických protilátek po ukončení léčby

Antigen	počet případů poklesu OD/ počet pozitivních případů	Hazard ratio	
		OS (p-value)	DSS (p-value)
HPV16VLP	42/68 (62 %)	1,136 (0,776)	1,629 (0,514)
HPV18VLP	21/30 (70 %)	0,349 (0,145)	0,335 (0,478)
HPV31VLP	26/37 (70 %)	1,734 (0,490)	1,285 (0,832)
HPV33VLP	15/26 (58 %)	1,262 (0,719)	0,742 (0,732)
HPV16 E6	84/90 (93 %)	0,256 (0,006)	0,169 (0,026)
HPV16 E7	65/80 (93 %)	1,171 (0,833)	0,929 (0,946)

(OS – celkové přežití, DSS – specifické přežití pro dané onemocnění)



Obr. 9 Křivky přežití podle Kaplan – Meiera

Dále byla analyzována prediktivní hodnota recidivy hladin HPV-specifických protilátek zjištěných před léčbou. U žádné z analyzovaných protilátek nebyl pozorován statisticky významný rozdíl u pacientů s recidivami a bez nich (tabulka 11).

Tab.11: Změny v mediánu OD indexu před zahájením léčby u nerecidivujících a recidivujících pacientů

	Medián OD indexu		
Antigen	nerecidivující pacienti	recidivující pacienti	p-value
HPV16 VLP	2,165	2,060	0,818
HPV18 VLP	0,805	0,690	0,198
HPV31 VLP	0,835	0,800	0,746
HPV33 VLP	0,765	0,710	0,798
HPV16 E6	5,745	7,320	0,207
HPV16 E7	4,735	3,620	0,534

#### 4.2.2 Změny v dynamice hladiny protilátek při dlouholetém sledování

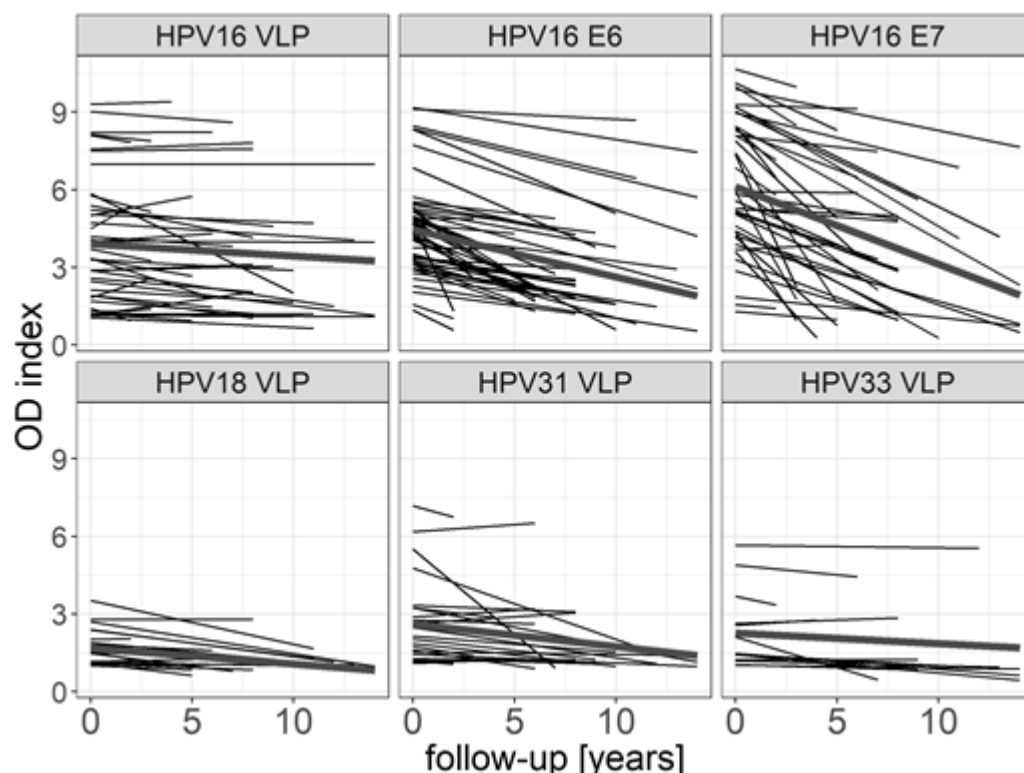
Z 93 pacientů, u kterých byl k dispozici kontrolní vzorek s odstupem 1 roku od ukončení léčby, bylo 58 schopno poskytnout vzorek séra ke kontrole s odstupem 2 až 14 let od zahájení léčby (průměrně s odstupem 7 let).

Při vstupu do studie před zahájením léčby byla séropozitivita proti HPV16, 18, 31 a 33 u těchto pacientů 79 %, 41 %, 47 % a 26 %, co se týče protilátek proti onkoproteinům 98 % pacientů mělo pozitivní HPV16 E6 protilátky a 76 % HPV16 E7 protilátky. Prevalence protilátek proti výše zmíněným antigenům VLP ve vzorcích dlouhodobého sledování se snížila na 76 %, 33 %, 40 % a 19 % a protilátky proti E6 a E7 onkoproteinům byly detekovány u 91 % a 60 % vzorků, v tomto pořadí.

U všech hodnocených protilátek byl zjištěn statisticky významný pokles jejich hladiny během dlouhodobého sledování a byla vypočtena průměrná roční změna OD indexu (tabulka 12; obrázek 10).

Tab. 12: Průměrná roční změna OD indexu při dlouhodobém sledování u pacientů, kteří byli pozitivní na protilátky proti danému antigenu před léčbou

antigen	počáteční OD index	průměrná roční změna (p-value)
HPV16 VLP	3,909	-0,047 (0,002)
HPV18 VLP	1,671	-0,060 (<0,001)
HPV31 VLP	2,621	-0,087 (<0,001)
HPV33 VLP	2,262	-0,041 (<0,001)
HPV16 E6	4,453	-0,183 (<0,001)
HPV16 E7	6,118	-0,300 (<0,001)



Obr. 10: Pokles OD indexu jednotlivých protilátek při dlouhodobém sledování

#### 4.3 Cíl III – Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní

Celková prevalence p16 positivity byla 8,3 % (10/120) pacientů. Ve skupině 1 byla exprese proteinu p16 zjištěna v 16,1 %, ve skupině 2 v 5,6 %. Ve skupině 1 kde byla provedena, kromě imunohistochemické detekce p16, také HPV DNA detekce. HPV DNA byla zjištěna u 9,7 % (3/31) nádorů, z toho HPV16 (N=1) a HPV18 (N=2). Dva pacienti byli pozitivní na HPV DNA i expresi p16, 2 pacienti byli pozitivní pouze na p16, bez přítomnosti HPV DNA positivity. Jeden pacient měl pouze HPV18 DNA pozitivitu, ale exprese p16 byla negativní.

4.3.1 Exprese proteinu p16 – vztah k demografickým a klinicko-patologickým parametrům  
Při analýze charakteristiky p16 pozitivních pacientů byli všichni (10/10) mužského pohlaví, ve skupině p16 negativních též převažovalo mužské pohlaví (75,5 %; 83/110) bez statisticky významného rozdílu ( $p=0,114$ ).

Průměrný věk ve skupině p16 pozitivních byl 57,2 let, průměrný věk ve skupině p16 negativních byl 59,4 let. Pacientů ve věku méně než 60 let bylo ve skupině p16 pozitivních 70,0 % (7/10), ve skupině p16 negativních 50,9 % (56/110), ( $p=0,329$ ).

Ve studii nebyl zjištěn statisticky významný vztah mezi kuřáctvím a zvýšenou expresí p16 ( $p=0,623$ ).

Ve skupině p16 pozitivních bylo nejvíce pacientů s nádorem v oblasti spodiny dutiny ústní (40,0 %; 4/10 pacientů), ve skupině p16 negativních byla polovina pacientů s nádory v oblasti těla jazyka (50,9 %; 56/110 pacientů). Při analýze vztahu exprese p16 s anatomickou lokalizací nebyla nalezena statistická významnost ( $p=0,578$ ).

Nebyl prokázán významný vztah exprese p16 a velikosti nádoru (pT) nebo rozsahu uzlinového postižení (pN) ( $p=0,900$ , respektive  $p=1,000$ ).

Data o perineurálním a extrakapsulárním šíření jsou k dispozici pouze u části souboru, jde o 4 nádory p16 pozitivní a 81 nádorů p16 negativních. Perineurální šíření bylo přítomno ve 100 % (4/4) p16 pozitivních a 37,5 % (30/81) p16 negativních nádorů ( $p=0,024$ ). Extrakapsulární šíření bylo popsáno u 50,0 % (2/4) p16 pozitivních a 23,5 % (19/81) p16 negativních ( $p=0,254$ ).

Pacienti s expresí p16 neměli vyšší riziko recidivy onemocnění ( $p=0,721$ ).

Celkové 5leté přežití (OS) bylo ve skupině p16 negativních delší, než u p16 pozitivních pacientů ( $p=0,019$ ). Nenašli jsme statisticky významný rozdíl v nádorově specifickém přežití (DSS) ( $p=0,952$ ) při porovnání p16 pozitivních pacientů s pacienty s p16 negativními nádory. Všechny klinicko-patologické parametry a vztah k expresi p16 jsou shrnuty v tabulkách (Tab. 3 a 13).

Tab. 13: Vztah klinicko-patologických parametrů a exprese p16 u karcinomů dutiny ústní

Klinicko-patologické parametry		p16 exprese				p-value
		p16 pozitivní		p16 negativní		
		N	%	N	%	
Věk v čase dg.	≤60	7	70	56	50,9	0,329
	>60	3	30	54	49,1	
Pohlaví	muž	10	100	83	75,5	0,114
	žena	0	0	27	24,5	
Kouření *	kuřák	5	55,6	58	56,8	0,623 ***
	bývalý kuřák	3	33,3	22	21,6	
	nekuřák	1	11,1	22	21,6	
Alkohol *	ano	1	11,1	40	39,2	0,150
	ne	8	88,9	62	60,8	
Anatomická lokalizace **	tělo jazyka	3	30	51	46,5	0,578 ***
	spodina dutiny ústní	4	40	31	28,2	
	tělo jazyka + spodina	0	0	5	4,5	
	retromolární oblast	0	0	5	4,5	
	dáseň	0	0	3	2,7	
	sliznice dutiny ústní	3	30	15	13,6	
pT	pT1	4	40	47	42,7	0,900 ***
	pT2	5	50	47	42,7	
	pT3	1	10	11	10,0	
	pT4	0	0	5	4,6	
pN	N0	5	50	58	52,7	1,000
	N+	5	50	52	47,3	
Grading *	G1	1	10	23	21,9	0,553 ***
	G2	7	70	70	66,7	
	G3	2	20	12	11,4	
Adjuvantní radioterapie	ne	1	10	38	34,5	0,164
	ano	9	90	72	65,5	
Recidiva	ne	8	80	76	69,1	0,721
	ano	2	20	34	30,9	
Perineurální šíření *	ne	0	0	30	37,5	0,024
	ano	4	100	50	62,5	
Extrakapsulární šíření *	ne	2	50	62	76,5	0,254
	ano	2	50	19	23,5	
Stav při kontrole po 5 letech	žije	1	10	58	52,7	0,019
	zemřel	9	90	52	47,3	

(\* některé data se zpětně nepodařilo dohledat; \*\* některé primární nádory měly více než jednu anatomickou lokalizaci; \*\*\* u analýzy byl použit Pearsonův test)

#### 4.3.2 Faktory ovlivňující pětileté přežití

Pětileté přežití od ukončení léčby při analýze podle Kaplan-Meiera bylo 49,2 % (59/120), z toho u mužů 44,0 % (41/93) a u žen 66,7 % (18/27). Pohlaví bylo vyhodnoceno jako statisticky významný faktor ovlivňující 5leté přežití pacientů ( $p=0,05$ ).

Věk při diagnóze neovlivňoval 5leté přežití pacientů ( $p=0,771$ ). Ani v Coxově modelu proporcionálních rizik věk neměl vliv na riziko úmrtí ( $p=0,902$ ; HR=0,965; 95 % CI 0,545 – 1,708). Kouření také neovlivňovalo 5leté přežití pacientů ( $p=0,586$ ). Ani v Coxově modelu proporcionálních rizik nemělo kouření vliv na riziko úmrtí ( $p=0,295$ ; HR=1,476; 95 % CI 0,715 – 3,58).

Anatomická lokalizace neovlivňovala 5leté přežití ( $p=0,349$ ). Pět let přežívalo 60,0 % (24/40) pacientů s karcinomem dutiny ústní, 45,8 % (27/59) pacientů s karcinomem těla jazyka, 44,4 % (8/18) pacientů s karcinomem jiné části dutiny ústní a 22,2 % (2/9) pacientů s karcinomem dásně nebo retromolární oblasti.

Klasifikace pT statisticky významně ovlivňovala 5leté přežití ( $p=0,016$ ). Pět let přežívalo 62,7 % (32/51) pacientů s pT1, 44,2 % (23/52) pacientů s pT2, 33,3 % (4/12) u pacientů s pT3 a 0,0 % (0/4) u pacientů s pT4. Naproti tomu v Coxově modelu proporcionálních rizik, pT nebyla statisticky významná ( $p=0,569$ ; HR=1,237; 95 % CI 0,595 – 2,572).

Postižení uzlin statisticky významně ovlivňovalo 5leté přežití. Pět let od ukončení léčby přežívalo 60,3 % (38/63) pacientů bez postižení uzlin a 36,8 % (21/57) pacientů s postižením uzlin ( $p=0,011$ ). V Coxově modelu proporcionálních rizik, N status statisticky významně ovlivňoval riziko úmrtí ( $p=0,007$ ; HR=2,159; 95 % CI 1,236 – 3,772).

Recidiva onemocnění také statisticky signifikantně ovlivnila 5leté přežití ( $p=0,001$ ). Pět let od ukončení léčby přežívalo 25 % (9/36) pacientů s recidivou a 59,5 % (50/84) pacientů bez recidivy. V Coxově modelu proporcionálních rizik, recidiva významně ovlivnila riziko úmrtí ( $p=0,007$ ; HR=2,263; 95 % CI 1,248 – 4,106).

Všechny klinicko-patologické parametry a jejich vztah k přežití jsou shrnuty v tabulce 14.

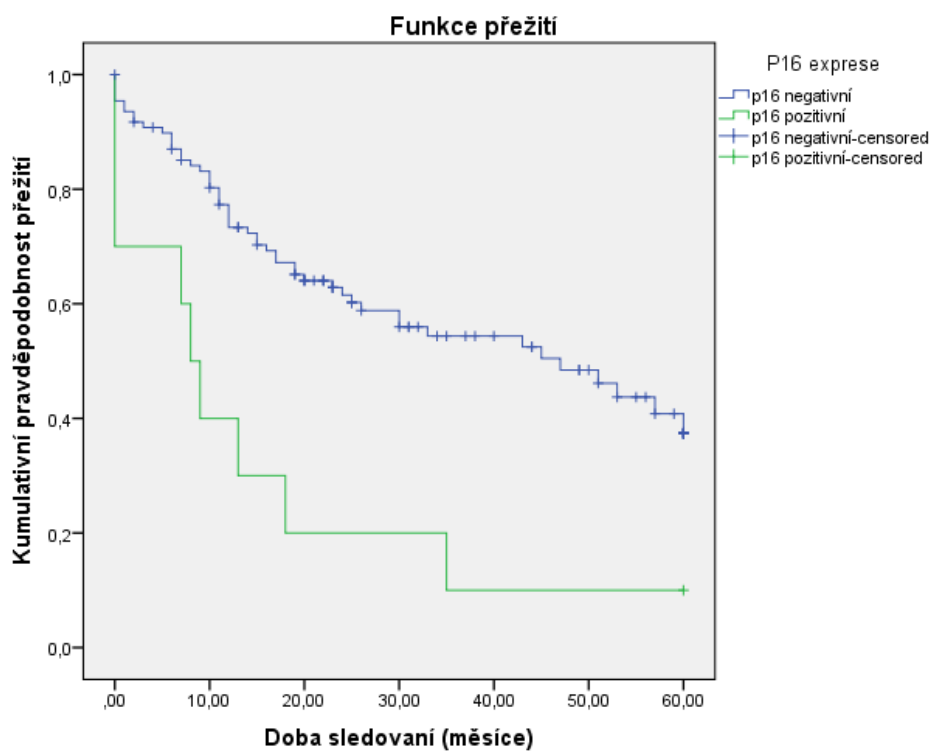


Tab. 14: Vztah klinicko-patologických parametrů a 5letého celkového přežití (OS)

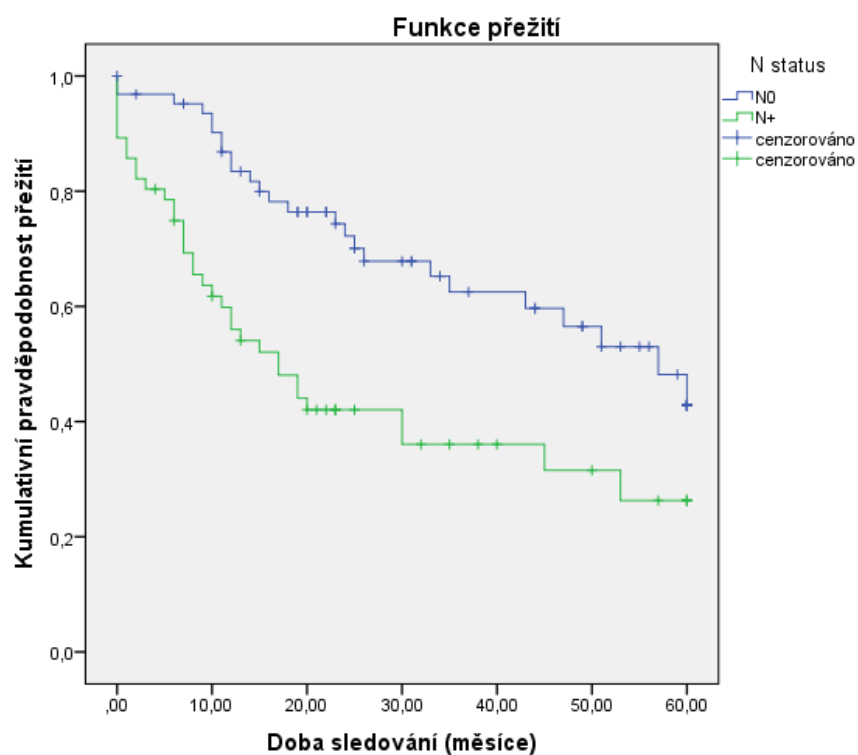
Klinicko-patologické Parametry		5leté přežívání (OS)				p-value
		žije		zemřel		
		N	%	N	%	
Věk v čase dg.	≤60	31	49,2	32	52,8	1,00
	>60	28	49,1	29	51,9	
Pohlaví	Muž	41	44,1	52	55,9	0,05
	žena	18	66,7	9	33,3	
Kouření *	Kuřák	31	49,2	32	50,8	0,803 ***
	bývalý kuřák	12	48,0	13	52,0	
	nekuřák	13	56,5	10	43,5	
Alkohol *	ano	18	43,9	23	56,1	0,329
	ne	38	54,3	32	45,7	
Anatomická lokalizace **	tělo jazyka	26	44,1	28	45,9	0,349 ***
	spodina dutiny ústní	22	37,3	13	21,3	
	tělo jazyka + spodina	2	3,4	3	4,9	
	retromolární oblast	1	1,7	4	6,6	
	dáseň	1	1,7	2	3,3	
	sliznice dutiny ústní	7	11,8	11	18,0	
pT	pT1	32	62,7	19	37,3	0,016 ***
	pT2	23	44,2	29	55,8	
	pT3	4	33,3	8	66,7	
	pT4	0	0	4	100	
pN	N0	38	60,3	25	39,7	0,011
	N+	21	36,8	36	63,2	
Grading *	G1	13	54,2	11	45,8	0,281 ***
	G2	38	49,4	39	50,6	
	G3	4	28,6	10	71,4	
Adjuvantní radioterapie	ne	27	69,2	12	30,8	0,003
	ano	32	39,5	49	60,5	
Recidiva	ne	50	59,5	34	40,5	0,001
	ano	9	25,0	27	75,0	
Perineurální šíření *	ne	35	70,0	15	30,0	<0,001
	ano	10	29,4	24	70,6	
Extrakapsulární šíření *	ne	40	62,5	24	37,5	0,011
	ano	6	28,6	15	71,4	
p16 exprese	p16 negativní	58	52,7	52	47,3	0,017
	p16 pozitivní	1	10,0	9	90,0	

(\* některé data se zpětně nepodařilo dohledat; \*\* některé primární nádory měly více než jednu anatomickou lokalizaci; \*\*\* u analýzy byl použitý Pearsonův test)

Jako statisticky významné faktory negativně ovlivňující 5leté přežití byly potvrzeny: pozitivní exprese p16 (obrázek 11), vyšší status N (obrázek 12), vyšší status T (obrázek 13) a recidiva onemocnění (obrázek 14). Faktory kouření (obrázek 15) a věk (obrázek 16) statisticky signifikantně neovlivnily 5leté přežití.

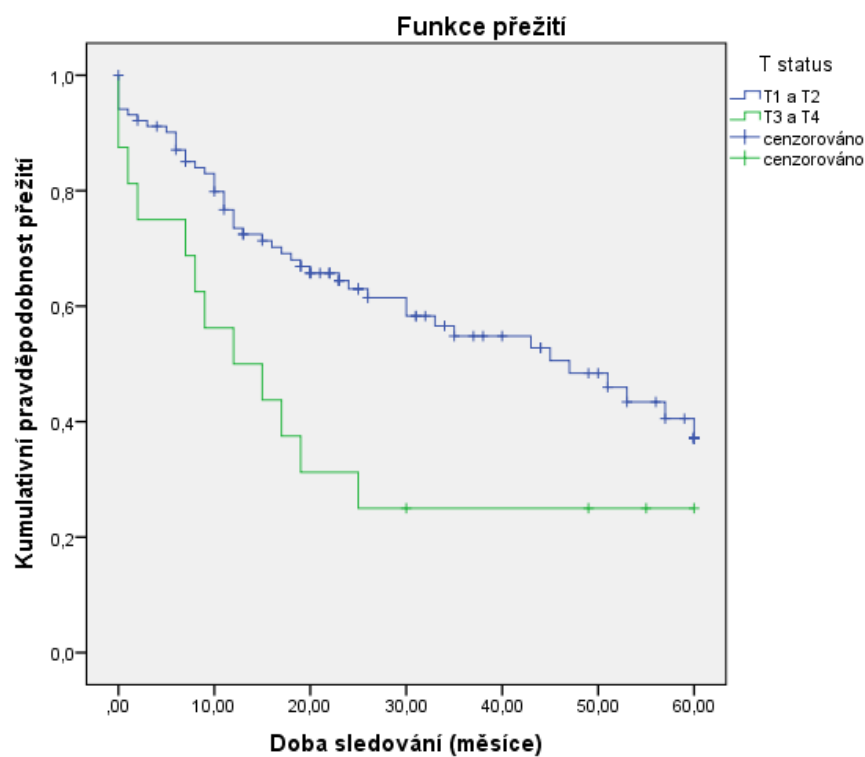


Obr. 11: Vztah 5letého celkového přežití (Kaplan-Meier) a exprese p16



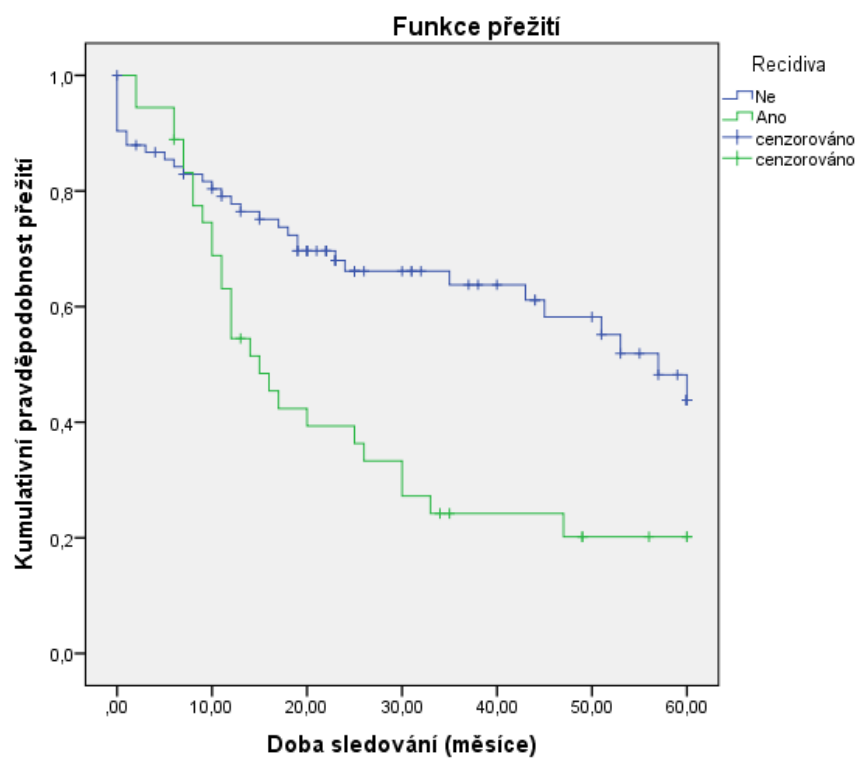
**p=0,001**

Obr. 12: Vztah 5letého celkového přežití (Kaplan-Meier) a pN statusu



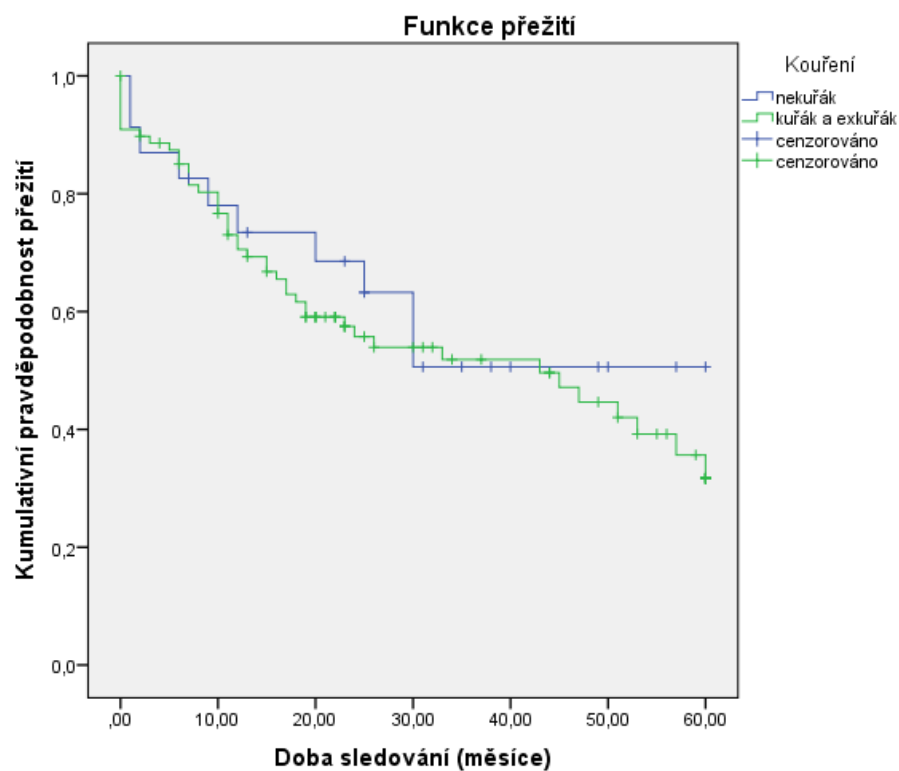
**p=0,018**

Obr. 13: Vztah 5letého celkového přežití (Kaplan-Meier) a pT statusu



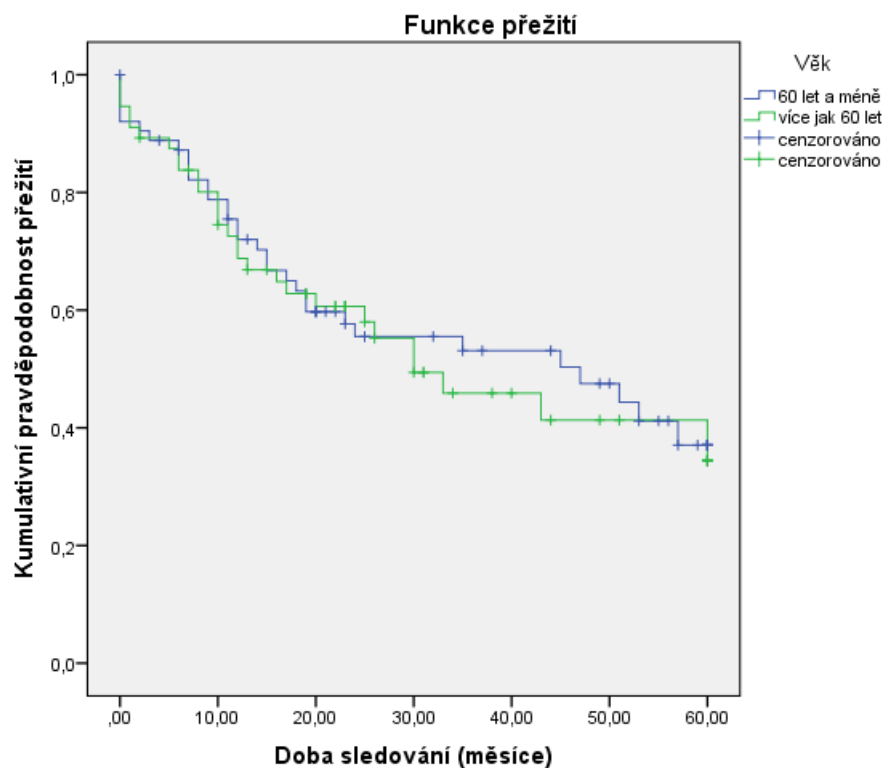
**p=0,001**

Obr. 14: Vztah 5letého celkového přežití (Kaplan-Meier) a recidivy základního onemocnění



**p=0,586**

Obr. 15: Vztah 5letého celkového přežití (Kaplan-Meier) a kouření



**p=0,771**

Obr. 16: Vztah 5letého celkového přežití (Kaplan-Meier) a věku

Pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik byly analyzovány jako faktory zhoršující 5leté přežití: p16 pozitivita, recidiva a postižení krčních uzlin (pN+) (Tabulka 15).

Tab. 15: Coxův model proporcionálních rizik

	p-value	Hazard ratio (HR)	95 % CI
p16 status	<b>0,000</b>	4,088	1,862 - 8,973
pN status	<b>0,007</b>	2,159	1,236 - 3,772
pT status	0,569	1,237	0,595 - 2,572
Kouření	0,295	1,476	0,712 - 3,058
Věk rozdělení	0,902	0,965	0,545 - 1,708
Recidiva	<b>0,007</b>	2,263	1,248 - 4,106

## 5. DISKUZE

### 5.1 Cíl I – Prevalence a rizikové faktory orální HPV infekce u zdravé populace

V této studii byla u zdravé populace střední Evropy stanovena prevalence orální HPV infekce. Konkrétně byly zkoumány dva soubory: Soubor I byl složen z mladých, z části vakcinovaných, studentů medicíny a soubor II zahrnoval starší zdravé jedince, kteří nebyli očkováni. Kromě toho byla v souboru I zkoumána možná asociace různých rizikových faktorů s infekcí HPV. Identifikace rizikové populace je důležitá pro cílené screeningové programy a pro definování dopadu rutinního očkování na orální prevalenci HPV. I když orální prevalence HPV byla významně nižší v souboru I (2,0 %) než v souboru II (8,8 %), prevalence HPV-specifických protilátek byly srovnatelné.

V této studii správně vyplnilo anonymní online dotazník a bylo zařazeno do studie 76 % účastníků, což je vyšší procento než 67 % uvedených ve studii orální prevalence v USA (Gillison et al., 2012) a mnohem lepší ve srovnání s další studií (33 %) (Conway et al., 2016). Je pravděpodobné, že studenti medicíny jsou informovanější a zodpovědnější, ve srovnání s náhodně vybranými skupinami v jiných studiích.

V této studii jsme odebírali od účastníků vzorky výplachu dutiny ústní. Recentní studie potvrzuje, že orální výplachy mají vyšší míru HPV positivity ve srovnání s orálními a orofaryngeálními kartáčkovými stěry, pravděpodobně v důsledku nižšího množství materiálu získaného pomocí kartáčků (Dona et al., 2019). Prevalence orální HPV u mladých dospělých jedinců byla nedávno sledována v několika studiích z jiných částí Evropy a světa. Přehledové studie za posledních deset let ukázaly orální prevalenci HPV 4,5 až 5,5 %, HR HPV prevalenci 2,7 až 3,5 % a HPV16 prevalenci 1,0 až 1,3 % (Kreimer et al., 2010, Shigeishi and Sugiyama, 2016). Nejnovější přehled (Tam et al., 2018), který zahrnoval 66 studií provedených v letech 1995 až 2017 s celkovým počtem zahrnutých vzorků 56 600, zaznamenal srovnatelná čísla; prevalenci orální jakékoliv HPV 7,7 %, HR HPV 3,5 % a HPV16 1,4 %. Poukázal také na geografickou variabilitu orální prevalence HPV, která byla nejvyšší v Jižní Americe (12,4 %) a nejnižší v Asii (2,6 %). V evropských studiích byla střední hodnota prevalence orální HPV infekce 9,9 %. Tento výsledek je srovnatelný s prevalencí HPV zjištěnou v našem Souboru II (8,8 %).

Specifická orální HPV prevalence pro jednotlivé věkové kategorie byla stanovena v americké studii zahrnující 5 579 jedinců ve věku 14–69 let. Nejvyšší prevalence byla pozorována ve věkových skupinách 30–34 let (7,0 %) a 60–64 let (11,0 %). Autoři předpokládali, že vysokou míru HPV positivity lze přičíst zvýšené sexuální aktivitě v prvním vzestupu a snížené

účinnosti imunitních mechanismů v důsledku stárnutí v druhém vzestupu (Gillison et al., 2012). Nedávné metaanalýzy uváděly nižší orální prevalenci HPV u žen ve srovnání s muži (Shigeishi and Sugiyama, 2016, Tam et al., 2018). V této studii bylo všech šest pozitivních účastníků ze souboru I ženy, ale spojení s pohlavím nebylo statisticky významné. To je v rozporu s výsledky jiných studií (Antonsson et al., 2014); nicméně skutečnost, že většina účastníků v souboru I byly ženy a že počet účastníků byl nízký, mohla výsledek této analýzy ovlivnit.

Několik studií prokázalo značný pokles prevalence orální HPV infekce u očkové populace. V Evropě studie Grun et al. (Grun et al., 2015) a Nordfors et al. (Nordfors et al., 2013) v populacích s mírou vakcinace 73 % a 64 % zjistili, že míra prevalence HPV v ústech byla 1,4 %, respektive 1,8 %. V souboru I aktuální studie byla pozorována srovnatelná orální HPV prevalence, navzdory nižšímu pokrytí vakcínou (40,5 %). Rozdíl v orální HPV prevalenci mezi dvěma zkoumanými soubory v této studii lze vysvětlit právě mírou proočkovanosti Souboru I. Polovina HPV-pozitivních účastníků ze Souboru I (3 ze 6) byla očkována (tabulka 6) a u žádného z nich nebyly identifikovány vakcinační typy HPV. HPV 16 byl detekován z orálního výplachu pouze u jednoho neočkovaného jedince. Navzdory skutečnosti, že ve studii bylo málo potvrzených orálních HPV DNA pozitivních, výsledky naznačují možný pokles orální HPV infekce v souvislosti s vakcinací. To je v souladu s výsledky větších studií (Herrero et al., 2013, Mehanna et al., 2019, Schlecht et al., 2019).

Prevalence anamnestických (VLP) HPV-specifických protilátek se mezi soubory statisticky nelišila pro žádný studovaný antigen (tabulka 7). V předchozí studii zahrnující obdobnou populaci (Hamsikova et al., 2013) byly použity antigeny pouze pro čtyři místo sedmi typů HR HPV. Prevalence HR HPV-specifických protilátek v aktuální studii byla 38,1 % v souboru I a 46,9 % v souboru II. Při porovnání údajů z plošné studie Hamšíková et al. v obecné populaci nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v mladší ani starší věkové kategorii (soubor I vs. věková skupina 18–35 let z plošné studie; soubor II vs. věková skupina 35–88 z plošné studie) (Hamsikova et al., 2013). Podobné výsledky jsme získaly při srovnání prevalence anamnestických protilátek proti HPV16: soubor I vs. věková skupina 18–35 z plošné studie: 15,5 % vs. 12 %; soubor II vs. věková skupina 35–88 z plošné studie: 16,1 % vs. 13 %.

V souboru I, ve které byl použit podrobný dotazník, jsme nebyli schopni identifikovat žádné rizikové faktory statisticky významně spojené s pozitivitou orální HPV infekce. Několik studií zjistilo, že sexuální chování, kouření a pití alkoholu (Gillison et al., 2012, Cook et al.,

2014) jsou významnými rizikovými faktory pro orální HPV infekci. Americká studie zaměřena na vliv sexuálního chování na orální HPV infekci zaznamenala vyšší prevalenci u jedinců, kteří měli orální sexuální styk v posledních třech měsících před odběrem (D'Souza et al., 2014). V aktuální studii měli všichni jedinci s pozitivním vzorkem orální HPV infekce za posledních 12 měsíců více než jednoho partnera pro orální sexuální styk; výsledek ale nebyl statisticky významný kvůli malému počtu pozitivně testovaných jedinců ve studii.

Hlavní limitací této studie je nerandomizovaný výběr účastníků souboru I; studenti medicíny mají dobré znalosti o sexuálně přenosných nemocech a bariérové antikoncepci. Malý počet účastníků, mohl ovlivnit statistickou významnost asociace HPV infekce s rizikovými faktory. Výsledky jsou však srovnatelné s podobně koncipovanou studií (Antonsson et al., 2014). Další limitací, podobně jako v jiných studiích, je skutečnost, že prevalence orální HPV je obecně nízká. Důležitost některých rizikových faktorů proto nemusela být zjevná. Další rozsáhlejší studie s delší dobou sledování by mohly odhalit prognostický význam positivity na HPV DNA, tak na HPV-specifické protilátky.

## **5.2 Cíl II – Prognostický význam HPV-specifických protilátek po léčbě u pacientů s nádory orofaryngu**

V této studii jsme analyzovali změny hladin HPV – specifických protilátek u pacientů s nádory hlavy a krku při dlouhodobém sledování od 2 do 14 let po ukončení léčby. Pozorovali jsme přítomnost specifických protilátek proti VLP a také proti HPV16 E6 a E7 onkogenům u pacientů až 14 let po ukončení léčby. Hladina všech protilátek proti všem testovaným antigenům se však postupem času statisticky významně snižovala. Při dlouhodobém sledování byl pokles statisticky významný pro všechny protilátky.

Při srovnání pacientů s recidivami a bez nich rok po léčbě jsme pozorovali pokles všech protilátek u pacientů bez recidiv, ale hladina většiny testovaných protilátek se snížila také u pacientů s recidivami. Jedině u protilátek specifických pro HPV16 E7 byl rozdíl ve změnách hladin protilátek mezi recidivujícími a nerecidivujícími pacienty statisticky významný.

Jak již bylo potvrzeno v dříve publikovaných studiích, přítomnost HPV protilátek je markerem virové etiologie nádorového onemocnění a u pacientů s nádory orofaryngu je pozitivním prognostickým faktorem (Koslabova et al., 2013, Nelson et al., 2017). V této studii jsme zjišťovali prognostickou hodnotu hladin HPV-specifických protilátek při zahájení léčby pro recidivu onemocnění. Hladina testovaných protilátek nebyla prediktivní pro výskyt



recidiv, ale u pacientů, u nichž hladina protilátek specifických pro HPV16 E6 po ročním sledování poklesla, byl zjištěn významný rozdíl v jejich přežití.

Jen málo studií hodnotilo dynamiku HPV – specifických protilátek po ukončení léčby. U pacientů léčených pro cervikální intraepiteliální neoplazii nebo karcinom děložního hrdla (KDH) byly změny ve hladině protilátek patrné až po relativně dlouhém časovém období (Hamsikova et al., 2000, Elfgrén et al., 1996). Pokles hladin protilátek proti virovým onkoproteinům HPV 16 E6 a E7 byl zaznamenán v několika studiích s KDH, ale u anamnestických protilátek (VLP) byl pokles méně patrný (Baay et al., 1999, Tachezy et al., 2006). Jen několik studií dosud se zaměřilo na dynamiku HPV-specifických protilátek u pacientů s HNC a většina z nich byla krátkodobá a došla k podobným pozorováním jako studie u pacientů s KDH (Koslabova et al., 2013, Zhang et al., 2017, Rubenstein et al., 2011). U pacientek s KDH bylo u recidivujících onemocnění v jedné studii zaznamenáno zvýšení protilátek proti E7 (Baay et al., 1999), zatímco u jiných studiích s KDH se toto pozorování nepotvrdilo (Lenner et al., 1995).

V této studii jsme při jednoročním sledování pozorovali, že protilátky proti testovaným antigenům se snížily u nerecidivujících i recidivujících pacientů po ukončení léčby karcinomů hlavy a krku (HNC). Spector a kol. (Spector et al., 2017) pozorovali vyšší hladiny protilátek HPV16 E6 a E7 při diagnostice a sledování u recidivujících pacientů a rychlejší pokles protilátek E7 u pacientů bez recidiv. Jiné studie naopak nepozorovaly rozdíly v hladinách protilátek HPV16 E6 a E7 u pacientů s recidivami a bez nich (Zhang et al., 2017, Lang Kuhs et al., 2017).

V našem souboru pacientů s orofaryngeálními nádory jsme vyhodnotili vliv poklesu hladiny protilátek detekovaných jeden rok po léčbě na přežití pacientů a zjistili jsme, že pokles hladiny HPV16 E6 – specifických protilátek je prediktivním faktorem celkového i specifického přežití.

U pacientů s HNC se většina recidiv vyskytuje během prvního roku po ukončení léčby. Dlouhodobé následné studie proto mají omezenou možnost zahrnout velký počet pacientů s recidivou nebo duplicitou. Při jednoročním sledování jsme zjistili recidivy u 5 pacientů. Při dlouhodobém sledování prováděném s odstupem 2-14 let po ukončení léčby jsme odebrali vzorky od 58 z 93 pacientů a pouze dva z nich měli v době dlouhého sledování duplicitu (více než 5 let od ukončení léčby). Pět pacientů, kteří měli detekovanou recidivu v jednoročním sledování, nebylo z důvodu úmrtí zahrnuto do dlouhodobého sledování.

### **5.3 Cíl III – Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní**

Ve studii jsme hodnotili u nádorů dutiny ústní závislost p16 pozitivitu na demografických a klinických parametrech a také prognostickou hodnotu. Z literatury víme, že konkordance mezi HPV DNA pozitivitou a p16 pozitivitou je u orofaryngeálních dlaždicobuněčných karcinomů vysoká (93 %) ((Prigge et al., 2017, Rotnaglova et al., 2011). Otázkou je, jaká je konkordance u neorofaryngeálních dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku. Některé studie uvádějí, že konkordance je výrazně nižší (Hoffmann et al., 2012, Nemes et al., 2006). Proto jsme se zaměřili na doplnění znaku HPV DNA pozitivitu a u těch vzorků, kde bylo možné doplnit i expresi proteinu p16 a provést analýzu jejich vztahu a vztahu k prognóze pacientů s těmito nádory. Pozitivita HPV DNA a současně exprese p16, jsme detekovali u 2/31 pacientů, 2/31 pacientů byli pozitivní pouze na p16, ale přítomnost HPV DNA se v nádorech těchto pacientů nepotvrdila. U jednoho pacienta byla přítomna HPV DNA (typ 18), ale exprese p16 byla naopak negativní. Na rozdíl od orofaryngeálních karcinomů se i v našem malém podsouboru pacientů nejvíce pozitivita p16 exprese jako spolehlivý marker HPV etiologie u nádorů dutiny ústní.

V našem zkoumaném souboru byla prevalence p16 pozitivitu 8,3 %, což je v souladu s recentními evropskými studiemi z Německa a Španělska, kde zjistili prevalenci p16 pozitivních pacientů s karcinomem dutiny ústní 7 % a 11 % (Grobe et al., 2013, Rodriguez-Santamarta et al., 2016).

Vztah mezi expresí p16 jako nepřímým markerem aktivní HPV infekce, která je spojena s lepší prognózou pacientů je využívána rutinně u nádorů orofaryngu. Existuje však velké spektrum nádorů se zvýšenou expresí p16, u kterých není HPV infekce kauzálním agens. U těchto nádorů může být zvýšená p16 exprese způsobena například genovou mutací oblastí, které jeho expresi reguluje. Pro některé nádory (karcinom plic nebo maligní melanom), je ztráta exprese p16 spojená s horší prognózou (Yanagawa et al., 2002), u neuroblastomu byla zvýšená exprese p16 asociována s horší prognózou (Omura-Minamisawa et al., 2001).

Studie, které zkoumaly vztah mezi p16/HPV DNA pozitivitou a jejím vlivem na celkové i specifické přežití pacientů po léčbě karcinomu dutiny ústní jsou nejednoznačné. Některé korelují s výsledky naší studie a udávají horší prognózu u p16/HPV DNA pozitivních pacientů (Duray et al., 2012, Lee et al., 2015, Saghravarian et al., 2016), jiné naopak udávají lepší prognózu u pacientů s p16/HPV DNA pozitivitou u karcinomů dutiny ústní (Hoffmann et al., 2012, Minami et al., 2017, Satgunaseelan et al., 2016).

V citovaných studiích měli pacienti s p16/HPV DNA pozitivitou třikrát větší riziko vzdálených metastáz a 2–3krát vyšší pravděpodobnost úmrtí, ve srovnání s p16/HPV DNA negativními nádory. Příčiny však nejsou zcela jasné. Někteří autoři zdůrazňují, že p16 exprese nemusí být známkou HPV infekce u karcinomů dutiny ústní a jde tedy o samostatný prognostický marker. Jako vysvětlení se taky nabízí, že nadměrná exprese p16 vede ke snížení invazivity redukcí matricových metaloproteináz (MMP-1 a MMP-9). (Kalfert et al., 2014).

Recentně publikovaná česká studie se souborem o velikosti 78 pacientů s orálními karcinomy neprokázala statisticky signifikantní rozdíly v 3letém přežití mezi pacienty s p16 pozitivními nádory ve srovnání s pacienty s p16 negativními nádory. V článku však chybí jasné rozdělení pacientů dle anatomické lokalizace nádoru a zdá se, že v souboru jsou zahrnuti i pacienti s nádory kořene jazyka (Blahak et al., 2019).

Závěry z publikovaných studií se značně liší. Z výsledků vyplývá, že prevalence HPV DNA v nádorech dutiny ústní je výrazně nižší než u nádorů orofaryngu a zdá se, že není korelace mezi přítomností HPV DNA a expresí p16 v těchto nádorech. Otázka HPV etiologie u nádorů dutiny ústní tedy není zatím objasněna. Exprese p16 se, na základě našich i publikovaných dat, zdá být spíše negativním prognostickým faktorem, toto pozorování bude muset být ověřeno v rámci studií s větším souborem pacientů. Z dalších faktorů negativně ovlivňujících prognózu byly v naší studii identifikovány recidiva onemocnění, a pozitivita postižení uzlin. Pozitivita regionálních lymfatických uzlin měla taky v recentní přehledové studii negativní dopad na celkové a nádorově specifické přežití (de Moraes et al., 2017).

## 6. ZÁVĚRY

Prevalence orální HPV pozitivita je u zdravé české populace ve věku 20-35 let 2 %. Séropozitivita na jakýkoli typ HPV byla u nevakcinovaných účastníků 63,7 %. Prevalence protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 je velmi nízká; 1,8 % (3/168) pro E6 a 3,6 % (6/174) pro E7. Žádný ze zkoumaných demografických parametrů a faktorů sexuálního chování nebyl pro HPV pozitivitu statisticky významný. Prevalence orální HPV byla při porovnání s kontrolním souborem probandů ve věku 35 až 85 let významně nižší v souboru mladší částečně vakcinované populace (míra proočkovanosti: 40,6 %). Prevalence HPV-specifických protilátek byla při porovnání souborů stejná. Míra pozitivita kapsidových protilátek (VLP) a protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 není závislá na věku ani kolektivní imunitě dané částečnou vakcinací.

U pacientů s orofaryngeálním karcinomem Během dlouhodobého sledování (2-14 let) dynamiky kapsidových (anamnestických) protilátek a protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 u pacientů s orofaryngeálním karcinomem po ukončení byl zjištěn statisticky významný pokles jejich hladiny během dlouhodobého sledování. U protilátek proti onkoproteinům E6 a E7 byl statisticky významný pokles již při prvním kontrolním odběru s odstupem 1 roku. Kapsidové (anamnestické) protilátky měli významný pokles až při druhém odběru s odstupem 2-14 let od ukončení léčby. Statisticky významný pokles kapsidových protilátek byl s odstupem 10 let od ukončení léčby. V souboru pacientů s orofaryngeálními nádory byl vyhodnocen vliv poklesu hladiny protilátek detekovaných po léčbě na přežití pacientů a bylo zjištěno, že pokles hladiny HPV16 E6 – specifických protilátek je prediktivním faktorem celkového i specifického přežití. Pacienti bez recidivy základního onemocnění měli statisticky významně vyšší pokles hladiny protilátek v porovnání s analyzovanými pacienty s recidivou nebo duplicitou základního onemocnění.

Prevalence pozitivita proteinu p16 u pacientů operovaných pro karcinom dutiny ústní je 8,3 % (10/120 pacientů). Jako statisticky významné prognostické faktory negativně ovlivňující 5leté přežití byly potvrzeny: pozitivní exprese p16, vyšší status N, vyšší status T a recidiva onemocnění. Pozitivita proteinu p16 byl vyhodnocen jako nejvýznamnější faktor, statisticky významně zhoršující celkové 5leté přežití pacientů s dlaždicobuněčnými karcinomy dutiny ústní ( $p=0,019$ ). Vliv exprese p16 na celkové přežití je tedy u opačný u karcinomu dutiny ústní než u karcinomu orofaryngu. U nádorově specifického přežití (DSS) nebyl vliv exprese p16 prokázán ( $p=0,952$ ).

## 7. LITERATURA

- AHMADI, N., AHMADI, N., CHAN, M. V., HUO, Y. R., SRITHARAN, N. & CHIN, R. 2018. Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Survival in the Context of Human Papillomavirus: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cureus*, 10, e2234.
- ANG, K. K., HARRIS, J., WHEELER, R., WEBER, R., ROSENTHAL, D. I., NGUYEN-TAN, P. F., WESTRA, W. H., CHUNG, C. H., JORDAN, R. C., LU, C., KIM, H., AXELROD, R., SILVERMAN, C. C., REDMOND, K. P. & GILLISON, M. L. 2010. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 363, 24-35.
- ANTONSSON, A., CORNFORD, M., PERRY, S., DAVIS, M., DUNNE, M. P. & WHITEMAN, D. C. 2014. Prevalence and risk factors for oral HPV infection in young Australians. *PLoS One*, 9, e91761.
- BAAY, M. F., DUK, J. M., BURGER, M. P., DE BRUIJN, H. W., STOLZ, E. & HERBRINK, P. 1999. Humoral immune response against proteins E6 and E7 in cervical carcinoma patients positive for human papilloma virus type 16 during treatment and follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18, 126-32.
- BLAHAK, J., ZELINKA, J., GUMULEC, J., MACHACEK, C., DANEK, Z. & BULIK, O. 2019. HPV, protein p16 and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*.
- CASTELLSAGUE, X., ALEMANY, L., QUER, M., HALEC, G., QUIROS, B., TOUS, S., CLAVERO, O., ALOS, L., BIEGNER, T., SZAFAROWSKI, T., ALEJO, M., HOLZINGER, D., CADENA, E., CLAROS, E., HALL, G., LACO, J., POLJAK, M., BENEVOLO, M., KASAMATSU, E., MEHANNA, H., NDIAYE, C., GUIMERA, N., LLOVERAS, B., LEON, X., RUIZ-CABEZAS, J. C., ALVARADO-CABRERO, I., KANG, C. S., OH, J. K., GARCIA-ROJO, M., ILJAZOVIC, E., AJAYI, O. F., DUARTE, F., NESSA, A., TINOCO, L., DURAN-PADILLA, M. A., PIROG, E. C., VIARHEICHYK, H., MORALES, H., COSTES, V., FELIX, A., GERMAR, M. J., MENA, M., RUACAN, A., JAIN, A., MEHROTRA, R., GOODMAN, M. T., LOMBARDI, L. E., FERRERA, A., MALAMI, S., ALBANESI, E. I., DABED, P., MOLINA, C., LOPEZ-REVILLA, R., MANDYS, V., GONZALEZ, M. E., VELASCO, J., BRAVO, I. G., QUINT, W., PAWLITA, M., MUNOZ, N., DE SANJOSE, S., XAVIER BOSCH, F., HEAD, I. C. O. I. H. I. & NECK CANCER

- STUDY, G. 2016. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst*, 108, djv403.
- CONWAY, D. I., ROBERTSON, C., GRAY, H., YOUNG, L., MCDAID, L. M., WINTER, A. J., CAMPBELL, C., PAN, J., KAVANAGH, K., KEAN, S., BHATIA, R., CUBIE, H., CLARKSON, J. E., BAGG, J., POLLOCK, K. G. & CUSCHIERI, K. 2016. Human Papilloma Virus (HPV) Oral Prevalence in Scotland (HOPSCOTCH): A Feasibility Study in Dental Settings. *PLoS One*, 11, e0165847.
- COOK, R. L., THOMPSON, E. L., KELSO, N. E., FRIARY, J., HOSFORD, J., BARKLEY, P., DODD, V. J., ABRAHAMSEN, M., AJINKYA, S., OBESSO, P. D., RASHID, M. H. & GIULIANO, A. R. 2014. Sexual behaviors and other risk factors for oral human papillomavirus infections in young women. *Sex Transm Dis*, 41, 486-92.
- D'SOUZA, G., KLUZ, N., WENTZ, A., YOUNGFELLOW, R. M., GRIFFIOEN, A., STAMMER, E., GUO, Y., XIAO, W. & GILLISON, M. L. 2014. Oral Human Papillomavirus (HPV) Infection among Unvaccinated High-Risk Young Adults. *Cancers (Basel)*, 6, 1691-704.
- DALLA TORRE, D., BURTSCHER, D., SOLDER, E., WIDSCHWENDTER, A., RASSE, M. & PUELACHER, W. 2016. The impact of sexual behavior on oral HPV infections in young unvaccinated adults. *Clin Oral Investig*, 20, 1551-7.
- DE MORAIS, E. F., MAFRA, R. P., GONZAGA, A. K. G., DE SOUZA, D. L. B., PINTO, L. P. & DA SILVEIRA, E. J. D. 2017. Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients: A Systematic Review. *J Oral Maxillofac Surg*, 75, 1555-1566.
- DI LONARDO, A., MARCANTE, M. L., POGGIALI, F. & VENUTI, A. 1998. HPV 16 E7 antibody levels in cervical cancer patients: before and after treatment. *J Med Virol*, 54, 192-5.
- DONA, M. G., PICHI, B., ROLLO, F., BENEVOLO, M., LATINI, A., LAQUINTANA, V., PELLINI, R., COLAFIGLI, M., FRASCA, M., GIULIANI, M. & CRISTAUDO, A. 2019. Human papillomavirus detection in matched oral rinses, oropharyngeal and oral brushings of cancer-free high-risk individuals. *Oral Oncol*, 91, 1-6.
- DURAY, A., DESCAMPS, G., DECAESTECKER, C., REMMELINK, M., SIRTAINÉ, N., LECHIEN, J., ERNOUX-NEUFCEUR, P., BLETARD, N., SOMJA, J., DEPUYDT, C. E., DELVENNE, P. & SAUSSEZ, S. 2012. Human papillomavirus DNA strongly

- correlates with a poorer prognosis in oral cavity carcinoma. *Laryngoscope*, 122, 1558-65.
- DURST, M., GISSMANN, L., IKENBERG, H. & ZUR HAUSEN, H. 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3812-5.
- DURZYNSKA, J., PACHOLSKA-BOGALSKA, J., KACZMAREK, M., HANC, T., DURDA, M., SKRZYPCZAK, M. & GOZDZICKA-JOZEFIAK, A. 2011. HPV genotypes in the oral cavity/oropharynx of children and adolescents: cross-sectional survey in Poland. *Eur J Pediatr*, 170, 757-61.
- ELFGREN, K., BISTOLETTI, P., DILLNER, L., WALBOOMERS, J. M., MEIJER, C. J. & DILLNER, J. 1996. Conization for cervical intraepithelial neoplasia is followed by disappearance of human papillomavirus deoxyribonucleic acid and a decline in serum and cervical mucus antibodies against human papillomavirus antigens. *Am J Obstet Gynecol*, 174, 937-42.
- FAKHRY, C., QUALLIOTINE, J. R., ZHANG, Z., AGRAWAL, N., GAYKALOVA, D. A., BISHOP, J. A., SUBRAMANIAM, R. M., KOCH, W. M., CHUNG, C. H., EISELE, D. W., CALIFANO, J. & VISCIDI, R. P. 2016. Serum Antibodies to HPV16 Early Proteins Warrant Investigation as Potential Biomarkers for Risk Stratification and Recurrence of HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, 9, 135-41.
- FRAYNE, S. M., PARKER, V. A., CHRISTIANSEN, C. L., LOVELAND, S., SEAVER, M. R., KAZIS, L. E. & SKINNER, K. M. 2006. Health status among 28,000 women veterans. The VA Women's Health Program Evaluation Project. *J Gen Intern Med*, 21 Suppl 3, S40-6.
- GILLISON, M. L., BROUTIAN, T., PICKARD, R. K., TONG, Z. Y., XIAO, W., KAHLE, L., GRAUBARD, B. I. & CHATURVEDI, A. K. 2012. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*, 307, 693-703.
- GILLISON, M. L., CASTELLSAGUE, X., CHATURVEDI, A., GOODMAN, M. T., SNIJDERS, P., TOMMASINO, M., ARBYN, M. & FRANCESCHI, S. 2014. Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. *Int J Cancer*, 134, 497-507.
- GROBE, A., HANKEN, H., KLUWE, L., SCHOLLCHEN, M., TRIBIUS, S., POHLENZ, P., CLAUDITZ, T., GROB, T., SIMON, R., SAUTER, G., HEILAND, M. &

- BLESSMANN, M. 2013. Immunohistochemical analysis of p16 expression, HPV infection and its prognostic utility in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 42, 676-81.
- GRUN, N., AHRLUND-RICHTER, A., FRANZEN, J., MIRZAIE, L., MARIONS, L., RAMQVIST, T. & DALIANIS, T. 2015. Oral human papillomavirus (HPV) prevalence in youth and cervical HPV prevalence in women attending a youth clinic in Sweden, a follow up-study 2013-2014 after gradual introduction of public HPV vaccination. *Infect Dis (Lond)*, 47, 57-61.
- HAJEK, M., SEWELL, A., KAECH, S., BURTNES, B., YARBROUGH, W. G. & ISSAEVA, N. 2017. TRAF3/CYLD mutations identify a distinct subset of human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 123, 1778-1790.
- HAMSIKOVA, E., LUDVIKOVA, V., STASIKOVA, J. & TACHEZY, R. 2013. Cross-sectional study on the prevalence of HPV antibodies in the general population of the Czech Republic. *Sex Transm Infect*, 89, 133-7.
- HAMSIKOVA, E., LUDVIKOVA, V., TACHEZY, R., KOVARIK, J., BROUSKOVA, L. & VONKA, V. 2000. Longitudinal follow-up of antibody response to selected antigens of human papillomaviruses and herpesviruses in patients with invasive cervical carcinoma. *Int J Cancer*, 86, 351-5.
- HERRERO, R., QUINT, W., HILDESHEIM, A., GONZALEZ, P., STRUIJK, L., KATKI, H. A., PORRAS, C., SCHIFFMAN, M., RODRIGUEZ, A. C., SOLOMON, D., JIMENEZ, S., SCHILLER, J. T., LOWY, D. R., VAN DOORN, L. J., WACHOLDER, S., KREIMER, A. R. & GROUP, C. V. T. V. 2013. Reduced prevalence of oral human papillomavirus (HPV) 4 years after bivalent HPV vaccination in a randomized clinical trial in Costa Rica. *PLoS One*, 8, e68329.
- HOFFMANN, M., TRIBIUS, S., QUABIUS, E. S., HENRY, H., PFANNENSCHMIDT, S., BURKHARDT, C., GOROGH, T., HALEC, G., HOFFMANN, A. S., KAHN, T., ROCKEN, C., HAAG, J., WATERBOER, T. & SCHMITT, M. 2012. HPV DNA, E6\*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer Lett*, 323, 88-96.
- CHUNG, C. H., ZHANG, Q., KONG, C. S., HARRIS, J., FERTIG, E. J., HARARI, P. M., WANG, D., REDMOND, K. P., SHENOUDA, G., TROTTI, A., RABEN, D., GILLISON, M. L., JORDAN, R. C. & LE, Q. T. 2014. p16 protein expression and



- human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 32, 3930-8.
- KALFERT, D., LUDVIKOVA, M., TOPOLCAN, O., WINDRICOVA, J., MALIROVA, E., PESTA, M. & CELAKOVSKY, P. 2014. Analysis of preoperative serum levels of MMP1, -2, and -9 in patients with site-specific head and neck squamous cell cancer. *Anticancer Res*, 34, 7431-41.
- KERO, K., RAUTAVA, J., SYRJANEN, K., WILLBERG, J., GRENMAN, S. & SYRJANEN, S. 2014. Smoking increases oral HPV persistence among men: 7-year follow-up study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33, 123-33.
- KHLEIF, S. N., DEGREGORI, J., YEE, C. L., OTTERSON, G. A., KAYE, F. J., NEVINS, J. R. & HOWLEY, P. M. 1996. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4350-4.
- KLOZAR, J. 2019. Clinical relevance of human papillomavirus outside of oropharynx. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 27, 80-84.
- KOSLABOVA, E., HAMSIKOVA, E., SALAKOVA, M., KLOZAR, J., FOLTYNOVA, E., SALKOVA, E., ROTNAGLOVA, E., LUDVIKOVA, V. & TACHEZY, R. 2013. Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *Int J Cancer*, 133, 1832-9.
- KREIMER, A. R. 2014. Prospects for prevention of HPV-driven oropharynx cancer. *Oral Oncol*, 50, 555-9.
- KREIMER, A. R., BHATIA, R. K., MESSEGUER, A. L., GONZALEZ, P., HERRERO, R. & GIULIANO, A. R. 2010. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis*, 37, 386-91.
- KREIMER, A. R., JOHANSSON, M., YANIK, E. L., KATKI, H. A., CHECK, D. P., LANG KUHS, K. A., WILLHAUCK-FLECKENSTEIN, M., HOLZINGER, D., HILDESHEIM, A., PFEIFFER, R., WILLIAMS, C., FREEDMAN, N. D., HUANG, W. Y., PURDUE, M. P., MICHEL, A., PAWLITA, M., BRENNAN, P. & WATERBOER, T. 2017. Kinetics of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Antibody Response Prior to Oropharyngeal Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 109.
- KREIMER, A. R., PIERCE CAMPBELL, C. M., LIN, H. Y., FULP, W., PAPENFUSS, M. R., ABRAHAMSEN, M., HILDESHEIM, A., VILLA, L. L., SALMERON, J. J.,

- LAZCANO-PONCE, E. & GIULIANO, A. R. 2013. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet*, 382, 877-87.
- LANG KUHS, K. A., KREIMER, A. R., TRIVEDI, S., HOLZINGER, D., PAWLITA, M., PFEIFFER, R. M., GIBSON, S. P., SCHMITT, N. C., HILDESHEIM, A., WATERBOER, T. & FERRIS, R. L. 2017. Human papillomavirus 16 E6 antibodies are sensitive for human papillomavirus-driven oropharyngeal cancer and are associated with recurrence. *Cancer*, 123, 4382-4390.
- LEE, L. A., HUANG, C. G., TSAO, K. C., LIAO, C. T., KANG, C. J., CHANG, K. P., HUANG, S. F., CHEN, I. H., FANG, T. J., LI, H. Y., YANG, S. L., LEE, L. Y., HSUEH, C., LIN, C. Y., FAN, K. H., CHANG, T. C., WANG, H. M., NG, S. H. & YEN, T. C. 2015. Human Papillomavirus Infections are Common and Predict Mortality in a Retrospective Cohort Study of Taiwanese Patients With Oral Cavity Cancer. *Medicine (Baltimore)*, 94, e2069.
- LENNER, P., DILLNER, J., WIKLUND, F., HALLMANS, G. & STENDAHL, U. 1995. Serum antibody responses against human papillomavirus in relation to tumor characteristics, response to treatment, and survival in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Immunol Immunother*, 40, 201-5.
- LEWIS, J. S., JR., BEADLE, B., BISHOP, J. A., CHERNOCK, R. D., COLASACCO, C., LACCHETTI, C., MONCUR, J. T., ROCCO, J. W., SCHWARTZ, M. R., SEETHALA, R. R., THOMAS, N. E., WESTRA, W. H. & FAQUIN, W. C. 2018. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*, 142, 559-597.
- LUPATO, V., HOLZINGER, D., HOFER, D., MENEGALDO, A., GIORGI ROSSI, P., DEL MISTRO, A., DA MOSTO, M. C., PAWLITA, M. & BOSCOLO-RIZZO, P. 2017. Prevalence and Determinants of Oral Human Papillomavirus Infection in 500 Young Adults from Italy. *PLoS One*, 12, e0170091.
- LYDIATT, W. M., PATEL, S. G., O'SULLIVAN, B., BRANDWEIN, M. S., RIDGE, J. A., MIGLIACCI, J. C., LOOMIS, A. M. & SHAH, J. P. 2017. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*, 67, 122-137.
- MEHANNA, H., BRYANT, T. S., BABRAH, J., LOUIE, K., BRYANT, J. L., SPRUCE, R. J., BATIS, N., OLALEYE, O., JONES, J., STRUIJK, L., MOLIJN, A., VORSTERS, A., ROSILLON, D., TAYLOR, S. & D'SOUZA, G. 2019. Human Papillomavirus

- (HPV) Vaccine Effectiveness and Potential Herd Immunity for Reducing Oncogenic Oropharyngeal HPV-16 Prevalence in the United Kingdom: A Cross-sectional Study. *Clin Infect Dis*, 69, 1296-1302.
- MEHANNA, H., OLALEYE, O. & LICITRA, L. 2012. Oropharyngeal cancer - is it time to change management according to human papilloma virus status? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 20, 120-4.
- MINAMI, K., KOGASHIWA, Y., EBIHARA, Y., NAKAHIRA, M., SUGASAWA, M., FUJINO, T. & YASUDA, M. 2017. Human papillomavirus and p16 protein expression as prognostic biomarkers in mobile tongue cancer. *Acta Otolaryngol*, 137, 1121-1126.
- MUNOZ, N. 2003. [Value of human papilloma virus testing in the diagnosis and screening of cervical neoplasia]. *Med Clin (Barc)*, 121, 455-6.
- NDIAYE, C., MENA, M., ALEMANY, L., ARBYN, M., CASTELLSAGUE, X., LAPORTE, L., BOSCH, F. X., DE SANJOSE, S. & TROTTIER, H. 2014. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*, 15, 1319-31.
- NELSON, H. H., PAWLITA, M., MICHAUD, D. S., MCCLEAN, M., LANGEVIN, S. M., ELIOT, M. N. & KELSEY, K. T. 2017. Immune Response to HPV16 E6 and E7 Proteins and Patient Outcomes in Head and Neck Cancer. *JAMA Oncol*, 3, 178-185.
- NEMES, J. A., DELI, L., NEMES, Z. & MARTON, I. J. 2006. Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102, 344-52.
- NORDFORS, C., GRUN, N., HAEGGBLOM, L., TERTIPIS, N., SIVARS, L., MATTEBO, M., LARSSON, M., HAGGSTROM-NORDIN, E., TYDEN, T., RAMQVIST, T. & DALIANIS, T. 2013. Oral human papillomavirus prevalence in high school students of one municipality in Sweden. *Scand J Infect Dis*, 45, 878-81.
- OMURA-MINAMISAWA, M., DICCIANNI, M. B., CHANG, R. C., BATOVA, A., BRIDGEMAN, L. J., SCHIFF, J., COHN, S. L., LONDON, W. B. & YU, A. L. 2001. p16/p14(ARF) cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma: p16 expression is associated with advanced stage disease. *Clin Cancer Res*, 7, 3481-90.

- PARKER, T. M., SMITH, E. M., RITCHIE, J. M., HAUGEN, T. H., VONKA, V., TUREK, L. P. & HAMSIKOVA, E. 2006. Head and neck cancer associated with herpes simplex virus 1 and 2 and other risk factors. *Oral Oncol*, 42, 288-96.
- PRIGGE, E. S., ARBYN, M., VON KNEBEL DOEBERITZ, M. & REUSCHENBACH, M. 2017. Diagnostic accuracy of p16(INK4a) immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 140, 1186-1198.
- RADY, P. L., SCHNADIG, V. J., WEISS, R. L., HUGHES, T. K. & TYRING, S. K. 1998. Malignant transformation of recurrent respiratory papillomatosis associated with integrated human papillomavirus type 11 DNA and mutation of p53. *Laryngoscope*, 108, 735-40.
- RAUTAVA, J., WILLBERG, J., LOUVANTO, K., WIDEMAN, L., SYRJANEN, K., GRENNAN, S. & SYRJANEN, S. 2012. Prevalence, genotype distribution and persistence of human papillomavirus in oral mucosa of women: a six-year follow-up study. *PLoS One*, 7, e42171.
- RODRIGUEZ-SANTAMARTA, T., RODRIGO, J. P., GARCIA-PEDRERO, J. M., ALVAREZ-TEIJEIRO, S., ANGELES VILLARONGA, M., SUAREZ-FERNANDEZ, L., ALVAREZ-ARGUELLES, M. E., ASTUDILLO, A. & DE VICENTE, J. C. 2016. Prevalence of human papillomavirus in oral squamous cell carcinomas in northern Spain. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 273, 4549-4559.
- ROTNAGLOVA, E., TACHEZY, R., SALAKOVA, M., PROCHAZKA, B., KOSL'ABOVA, E., VESELA, E., LUDVIKOVA, V., HAMSIKOVA, E. & KLOZAR, J. 2011. HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers. *Int J Cancer*, 129, 101-10.
- RUBENSTEIN, L. M., SMITH, E. M., PAWLITA, M., HAUGEN, T. H., HAMSIKOVA, E. & TUREK, L. P. 2011. Human papillomavirus serologic follow-up response and relationship to survival in head and neck cancer: a case-comparison study. *Infect Agent Cancer*, 6, 9.
- SABOL, I., SMAHELOVA, J., KLOZAR, J., MRAVAK-STIPETIC, M., GHEIT, T., TOMMASINO, M., GRCE, M. & TACHEZY, R. 2016. Beta-HPV types in patients with head and neck pathology and in healthy subjects. *J Clin Virol*, 82, 159-165.
- SAGHRAVANIAN, N., ZAMANZADEH, M., MESHKAT, Z., AFZAL AGHAEE, M. & SALEK, R. 2016. Evaluation of the Prevalence Rate and the Prognostic Effect of

- Human Papilloma Virus Infection in a Group of Patients With Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Iran J Cancer Prev*, 9, e3998.
- SATGUNASEELAN, L., VIRK, S. A., LUM, T., GAO, K., CLARK, J. R. & GUPTA, R. 2016. p16 expression independent of human papillomavirus is associated with lower stage and longer disease-free survival in oral cavity squamous cell carcinoma. *Pathology*, 48, 441-8.
- SEHR, P., ZUMBACH, K. & PAWLITA, M. 2001. A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology. *J Immunol Methods*, 253, 153-62.
- SHIGEISHI, H. & SUGIYAMA, M. 2016. Risk Factors for Oral Human Papillomavirus Infection in Healthy Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med Res*, 8, 721-9.
- SHOPE, R. E. & HURST, E. W. 1933. Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *J Exp Med*, 58, 607-24.
- SCHLECHT, N. F., MASIKA, M., DIAZ, A., NUCCI-SACK, A., SALANDY, A., PICKERING, S., STRICKLER, H. D., SHANKAR, V. & BURK, R. D. 2019. Risk of Oral Human Papillomavirus Infection Among Sexually Active Female Adolescents Receiving the Quadrivalent Vaccine. *JAMA Netw Open*, 2, e1914031.
- SIMONIDESOVA, S., HAMSIKOVA, E., KLOZAR, J. & TACHEZY, R. The prevalence of oral HPV infection in healthy populations: A systematic review with a focus on European populations. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 67, 175-183.
- SPECTOR, M. E., SACCO, A. G., BELLILE, E., TAYLOR, J. M. G., JONES, T., SUN, K., BROWN, W. C., BIRKELAND, A. C., BRADFORD, C. R., WOLF, G. T., PRINCE, M. E., MOYER, J. S., MALLOY, K., SWIECICKI, P., EISBRUCH, A., MCHUGH, J. B., CHEPEHA, D. B., ROZEK, L. & WORDEN, F. P. 2017. E6 and E7 Antibody Levels Are Potential Biomarkers of Recurrence in Patients with Advanced-Stage Human Papillomavirus-Positive Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 23, 2723-2729.
- TACHEZY, R., KLOZAR, J., RUBENSTEIN, L., SMITH, E., SALAKOVA, M., SMAHELOVA, J., LUDVIKOVA, V., ROTNAGLOVA, E., KODET, R. & HAMSIKOVA, E. 2009. Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. *J Med Virol*, 81, 878-87.

- TACHEZY, R., KLOZAR, J., SALAKOVA, M., SMITH, E., TUREK, L., BETKA, J., KODET, R. & HAMSIKOVA, E. 2005. HPV and other risk factors of oral cavity/oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Dis*, 11, 181-5.
- TACHEZY, R., MIKYSKOVA, I., LUDVIKOVA, V., ROB, L., KUCERA, T., SLAVIK, V., BEKOVA, A., ROBOVA, H., PLUTA, M. & HAMSIKOVA, E. 2006. Longitudinal study of patients after surgical treatment for cervical lesions: detection of HPV DNA and prevalence of HPV-specific antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 25, 492-500.
- TACHEZY, R., SMAHELOVA, J., KASPIRKOVA, J. & SALAKOVA, M. 2013. Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women. *PLoS One*, 8, e79156.
- TAM, S., FU, S., XU, L., KRAUSE, K. J., LAIRSON, D. R., MIAO, H., STURGIS, E. M. & DAHLSTROM, K. R. 2018. The epidemiology of oral human papillomavirus infection in healthy populations: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*, 82, 91-99.
- TERMINE, N., GIOVANNELLI, L., MATRANGA, D., CALECA, M. P., BELLAVIA, C., PERINO, A. & CAMPISI, G. 2011. Oral human papillomavirus infection in women with cervical HPV infection: new data from an Italian cohort and a metanalysis of the literature. *Oral Oncol*, 47, 244-50.
- TONG, F., GENG, J., YAN, B., LOU, H., CHEN, X., DUAN, C., HE, J., ZHANG, S., XIE, H., LI, H., YUAN, D., ZHANG, F., MENG, H. & WEI, L. 2018. Prevalence and Prognostic Significance of HPV in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma in Northeast China. *Cell Physiol Biochem*, 49, 206-216.
- VAN RANST, M., KAPLAN, J. B. & BURK, R. D. 1992. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 10), 2653-60.
- WONG, M. C. S., VLANTIS, A. C., LIANG, M., WONG, P. Y., HO, W. C. S., BOON, S. S., SZE, R. K. H., LEUNG, C., CHAN, P. K. S. & CHEN, Z. 2018. Prevalence and Epidemiologic Profile of Oral Infection with Alpha, Beta, and Gamma Papillomaviruses in an Asian Chinese Population. *J Infect Dis*, 218, 388-397.
- YANAGAWA, N., TAMURA, G., OIZUMI, H., TAKAHASHI, N., SHIMAZAKI, Y. & MOTOYAMA, T. 2002. Frequent epigenetic silencing of the p16 gene in non-small cell lung cancers of tobacco smokers. *Jpn J Cancer Res*, 93, 1107-13.

- ZHANG, Y., WATERBOER, T., HADDAD, R. I., MILES, B. A., WENTZ, A., GROSS, N. D., FAKHRY, C., QUON, H., LORCH, J. H., GOURIN, C. G., CLAYBURGH, D., MISIUKIEWICZ, K. J., RICHMON, J. D., ANDERSEN, P. E., POSNER, M. R. & D'SOUZA, G. 2017. Human papillomavirus (HPV) 16 antibodies at diagnosis of HPV-related oropharyngeal cancer and antibody trajectories after treatment. *Oral Oncol*, 67, 77-82.
- ZUMBACH, K., HOFFMANN, M., KAHN, T., BOSCH, F., GOTTSCHLICH, S., GOROGH, T., RUDERT, H. & PAWLITA, M. 2000. Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 85, 815-8.

## 8. PŘÍLOHY

### 8.1 Publikace, které jsou podkladem disertace

A) Publikace s IF

**S.Simonidesová, E. Hamšíková, J. Klozar, R. Tachezy; Výskyt orální HPV infekce u zdravé populace: Systematický přehled se zaměřením na evropskou populaci; Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 67, 2018, č. 4, s. 175-183, IF: 0,397**

**Simonidesova S, Hamsikova E, Ludvikova V, Klozar J, Vencalek O, Tachezy R.; Prognostic value of posttreatment HPV-specific antibodies in patients with oropharyngeal tumors. J Surg Oncol. 2019 Apr 15. doi: 10.1002/jso.25473. IF: 3,114**

**Maléřová S, Hejtmánková A., Hamsikova E, Saláková M., Šmahelová J., Klozar J, Tachezy R.; Prevalence and Risk Factors for Oral HPV in Healthy Population, in Central Europe Anticancer Res. 2020 Mar;40(3):1597-1604. IF: 1,935**

**Maléřová S., Kalfeřt D., Grega M., Tachezy R., Klozar J. Význam exprese proteinu p16 u dlaždicobuněčných karcinomů dutiny ústní; Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 2020, č. 2, s. 64-72, IF: 0,397**

B) Publikace bez IF

0

### 8.2 Publikace bez vztahu k tématu disertace

Publikace s IF

**J. Betka, J. Klozar, M. Kuchař, S. Simonidesová, M. Zábrodský, J. Plzák; Léky navozená spánková endoskopie – cesta k lepším chirurgickým výsledkům při léčbě syndromu obstrukční spánkové apnoe; Cesk Slov Neurol N 2016; 79/112(5): 516-520, IF: 0,209**

Publikace bez IF

0